

Strålingsinduserte primærradikaler
i krystallinsk L-asparagin
En EMR- og DFT (PBC)-studie

Live Furnes Øyen



Masteroppgave

Biofysikk og medisinsk fysikk

Fysisk institutt

UNIVERSITETET I OSLO

10. juni 2014

© Live Furnes Øyen

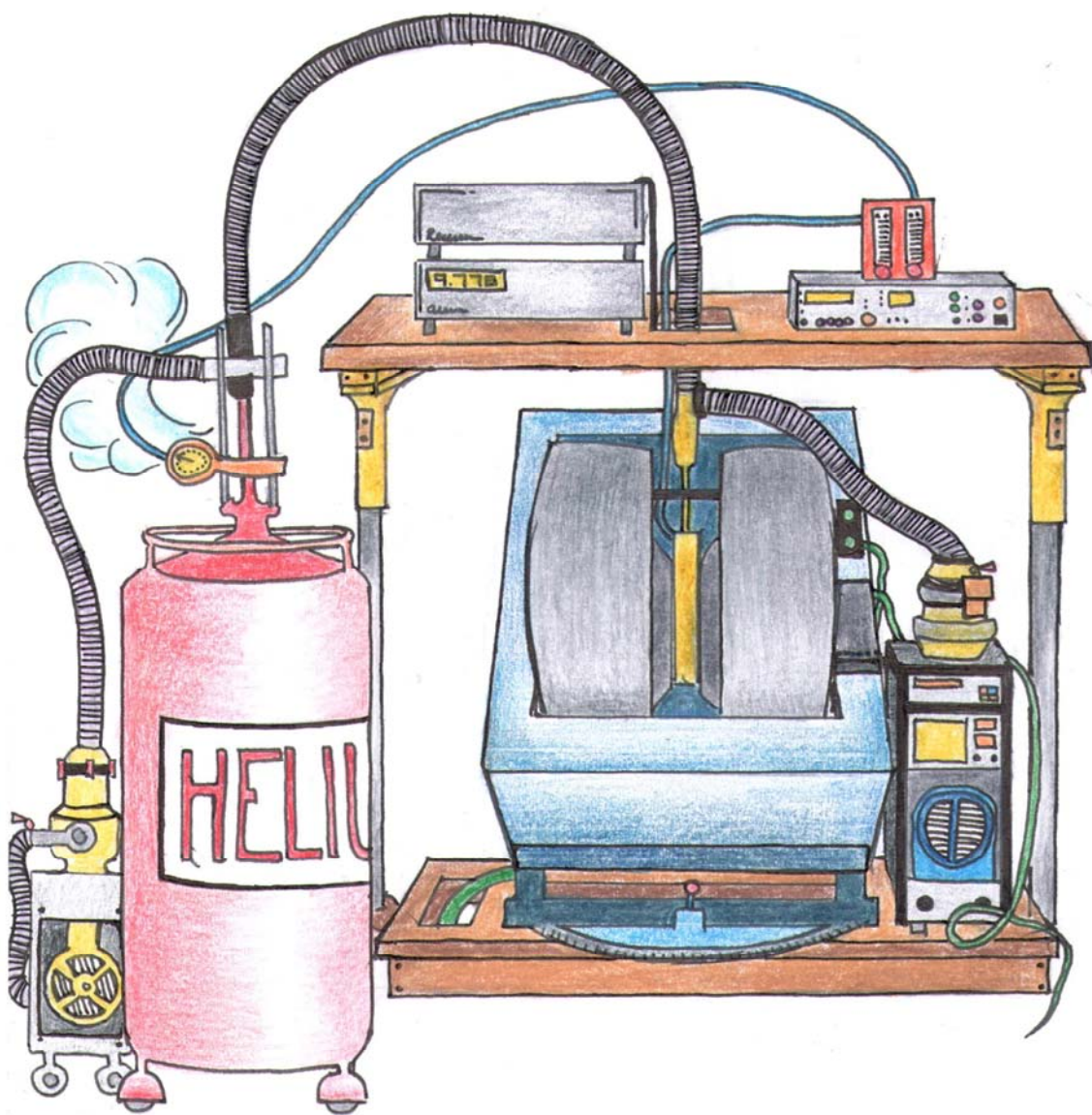
2014

Strålingsinduserte primærradikaler i krystallinsk L-asparagin
En EMR- og DFT (PBC)-studie

Live Furnes Øyen

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo



Kunstnerisk gjengivelse av eksperimentelt oppsett på EMR-laben,
tegnet av Live Furnes Øyen.

Forord

Jeg er stolt av å presentere min masteroppgave utført ved BMF-gruppen ved Fysisk institutt, Universitetet i Oslo. Jeg vil i første omgang benytte anledningen takke mine fire veiledere; hovedveileder Einar Sagstuen, sammen med Siv Gundrosen Aalbergsgjø, Eli Olaug Hole og Ingerid Skjei Knudtsen. Uten dere ville ikke det foreliggende arbeidet vært mulig å gjennomføre. Jeg er veldig takknemlig for at hver og en av dere alltid har møtt meg med en åpen dør og tatt dere god tid til både stort og smått. Jeg har lært utrolig masse av dere, og dere har bidratt til at mitt siste studieår på Blindern har vært både interessant, inspirerende og gøy – selv i eksperimentelt frustrerende perioder. Jeg er kjempefornøyd med valget av masteroppgave – tusen takk! Jeg vil også rette en takk til Efim Brondz for hans store innsats for at alt av eksperimentelt utstyr skulle være i god stand slik at vi kunne få gjennomført forsøkene. Jeg vil også nevne at jeg er utrolig fornøyd med å gjennomføre et masterstudie ved BMF-gruppen. I tillegg til at studiet har vært spennende, er det så mange hyggelige mennesker og godt miljø på her, og jeg kommer nok spesielt til å savne ”kake-fredagene”.

Etter fem år som student på Blindern vil jeg også benytte anledningen til takke mine medstudenter og ENT3R-kollegaer som har gjort studiehverdagen god. Jeg vil også si takk til venner og familie for å alltid ha støttet meg, gitt meg selvtillit og oppmuntring, og vist interesse for det jeg holder på med. Spesielt vil jeg takke min fantastiske niese, Josefine, som nok er den største oppmuntringen, og hvor jeg særlig vil trekke frem alle videosamtaler som har gjort at de lengste dagene på Blindern ikke føles så altfor lange.

Den største takken går til min kjære mann og bestevenn Håkon Øyen. Du får meg til å se ting i et annet perspektiv og ”heier på meg”. Jeg elsker at du fyller hjemmet vårt med musikk hver eneste dag! I tillegg til å lese korrektur, har du vært en ekstra stor støtte i den siste tiden mens jeg har skrevet på masteren mer eller mindre dag og natt – tusen takk!

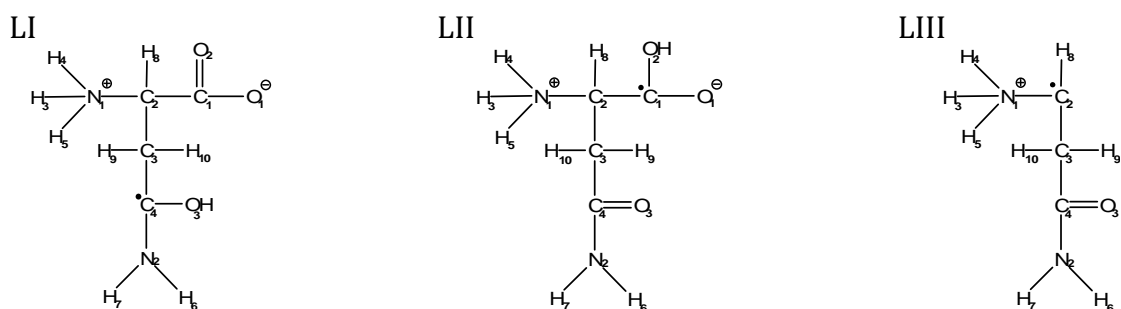
Juni 2014,

Live Furnes Øyen

Sammendrag

Dette er et studie av strålingsindusert primær radikaldannelse i aminosyren L-asparagin ved bruk av Elektron-Magnetisk Resonans (EMR) spektroskopi og molekylstrukturmodellering. Énkrystaller av L-asparagin monohydrat ble kjølt ned til 6 K og eksponert for ioniserende stråling *in situ*, og de eksperimentelle målingene på det bestrålte systemet ble utført ved den samme temperaturen. For å analysere data med hensyn på radikaldannelsene i krystallen, ble EPR og de assosierte teknikkene ENDOR og EIE benyttet. Det ble i tillegg utført molekylstrukturmodellering av de eksperimentelt foreslåtte radikalstrukturene med tetthetsfunksjonalteori (DFT) med periodiske grensebetingelser.

Ut fra eksperimentelle observasjoner og kvantekjemisk modellering er det identifisert tre lavtemperaturreadikaler i L-asparagin, kalt LI, LII og LIII. LI er identifisert som et protonert amid-anion, LII et protonert karboksyl-anion og LIII et dekarboksyleringsprodukt som antas å være et oksidasjonsprodukt. Skjematiske 2D-strukturer for de tre radikalene er vist nedenfor.



For alle de tre radikalmodellene var de eksperimentelle resultatene i godt samsvar med tilsvarende krystallografiske data, noe som gjorde at konklusjonene med hensyn på det uparede elektronets lokalisering og vekselvirkning med omgivelsene for hver modell hadde relativt stor sikkerhet. I tillegg ga beregningene av EMR-parametere fra molekylstrukturmodelleringene et meget godt samsvar med de eksperimentelt etablerte resultatene.

Resultatene fra dette studiet viser at L-asparagin har en strålingsrespons som er analog med den en observerer for andre aminosyrer. I tillegg observeres radikalet LI. Dette er første gang en full karakterisering av et slikt radikal i en aminosyres sidekjede har blitt gjennomført, og muligheten for å bekrefte eller avkrefte dannelsen av et slikt produkt var et av hovedmålene for denne oppgaven. Det blir også presentert mulige omdanningsmekanismer fra alle de tre lavtemperaturreadikalene til kjente stabile radikalprodukter ved romtemperatur.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Ioniserende stråling	1
1.2	Aminosyrer og radikaler i aminosyrer	2
1.3	Metoder brukt i oppgaven	4
1.4	Hensikt med oppgaven	5
2	Teori.....	7
2.1	EMR.....	7
2.1.1	Magnetisk moment og Zeemanvekselvirkning.....	7
2.1.2	Resonansbetingelsen.....	9
2.1.3	Hamiltonoperator for molekylært system	9
2.1.4	Vekselvirkningsmodeller.....	15
2.1.5	EMR-spektroskopi.....	19
2.2	Molekylstrukturberegninger	24
2.2.1	MO-teori.....	24
2.2.2	DFT.....	25
2.2.3	Basissett.....	26
2.2.4	Energifunksjonal.....	29
3	Metode.....	31
3.1	EMR.....	31
3.1.1	Krystallisering av L-asparagin	31
3.1.2	Montering.....	34
3.1.3	Røntgendiffraksjon	35
3.1.4	Eksperimentelt oppsett.....	37
3.1.5	Eksperimentell utførelse	38
3.1.6	Site-splitting og Schonlandtvetydighet.....	39
3.2	DFT	41
3.3	Analyseverktøy.....	42
4	Resultater og analyse.....	45
4.1	EMR.....	45
4.1.1	EPR.....	45

4.1.2	ENDOR og EIE.....	47
4.1.3	Prosessbeskrivelse for videre analyse.....	52
4.1.4	Radikal LI	54
4.1.5	Radikal LII.....	61
4.1.6	Radikal LIII	65
4.2	Molekylstrukturberegninger	78
4.2.1	LI.....	78
4.2.2	LII	81
4.2.3	LIII.....	84
4.3	Simulering av EPR-absorpsjonsspektre	88
4.3.1	LI.....	88
4.3.2	LII	89
4.3.3	LIII.....	90
4.4	Resultater ved høyere temperaturer	92
5	Diskusjon.....	99
5.1	Tidligere arbeid på L-asparagin.....	99
5.2	Protonert amid-anion	101
5.2.1	LI.....	101
5.2.2	Coleman's radikal III	103
5.3	Protonert karboksyl-anion	103
5.3.1	LII	103
5.3.2	Coleman's radikal I	105
5.4	Dekarboksyleringsprodukt	106
5.4.1	LIII.....	106
5.4.2	Coleman's radikal II.....	108
5.4.3	Oppsummering, Coleman's arbeid	108
5.5	Observasjoner ved høyere temperaturer	109
5.6	Videre reaksjonsgang ved høyere temperaturer	111
6	Oppsummering og forslag til videre arbeid.....	115
	Litteraturliste	117
	Appendiks	123
	A: KRYSTALLOGRAFISKE DATA	123
	B: OPTIMALISERTE VINKLER.....	128
	C: SCHONLANDVARIANTER	129
	D: MODELLERTE HYPERFINVEKSELVIRKNINGSTENSORER.....	130

E: COLEMANS TENSORER	136
F: POSTER	140

1 Innledning

1.1 Ioniserende stråling

Ioniserende stråling består av atomære partikler eller fotoner, og kan forekomme naturlig eller produseres kunstig [1]. Strålingen har tilstrekkelig høy energi til å slå ut elektroner ifra bundne tilstander. Store variasjoner i energi, vekselvirkningsegenskaper i materie, gjennomtrengelighet og tilgjengelighet er noen av faktorene som gjør at ulike typer stråling har blitt anvendt i ulike bruksområder, ikke minst til naturvitenskapelige, tekniske og medisinske formål, i over 100 år. Stråling i medisinsk sammenheng omfatter oftest diagnostisk og terapeutisk bruk.

Stråleterapi av kreftsykdom innebærer både kurerende behandling, som oftest kombinert med andre behandlingsformer, og smertelindring. Ved kurerende stråleterapi er formålet å fjerne kreftsvulsten, mens normalvevet rundt tumor skal skjermes best mulig. Målet er å drepe kreftceller, og det er DNA (DeoxyriboNucleic Acid), hovedsakelig lokalisert i cellekjernen, som er det viktigste målobjektet for strålebehandlingen [2]. Strålingens energiavsetning i DNA-molekylet, både *direkte* men også *indirekte* via omgivelsene, kan føre til skader eller fiksering av skader som kan være letale for cellen. Stråleskader som ikke lar seg reparere av cellenes enorme reparasjonsmekanismer eller som fører til genetiske endringer i DNA, vil oftest føre til apoptose¹ [3].

Både direkte og indirekte strålingsvekselvirkning fører i første omgang til eksitasjoner og ioniseringer i de eksponerte molekylene. De eksiterte molekylene vil vanligvis relativt raskt relaksere til grunntilstanden. De ioniserte produktene er karakterisert ved å ha et uparet elektron – et elektron som ikke inngår i slike elektronpar som normalt utgjør kjemiske bindinger – og er dermed et *radikal*. Disse ioniserte radikalene er forløpet for dannelsen av sekundære produkter, som vanligvis er nøytrale molekyler med et uparet elektron (nøytrale radikaler). Den ioniserende strålingens indirekte effekt på DNA går i hovedsak ut på ladnings- og elektronoverføring fra ioniserte atomer og molekyler i omgivelsene rundt (oftest vannmolekyler og proteiner). Slike prosesser vil ofte indusere radikaldannelse i DNA.

Elektroner har ladning og spinn, og ved dette også magnetisk moment. Som nevnt er elektronene i organiske molekyler vanligvis ordnet parvis i kjemiske bindinger, noe som fører til at deres magnetiske momenter vil kansellere hverandre. Vanlige molekyler er derfor

¹ Programmert celledød

diamagnetiske. Ioniserende stråling kan imidlertid i sin vekselvirkning splitte slike elektronpar og det dannes uparede elektroner. Dette fører til at prøven blir paramagnetisk. Et molekyl som har mistet et elektron blir et positivt ladd ion. Et ion kan også være negativt ladd, ved at et molekyl fanger opp et løsrevet elektron. Om molekylet avgir et elektron, kalles prosessen en oksidasjonsprosess og molekylet blir et kation. Opptak av et elektron kalles en reduksjonsprosess og molekylet blir et anion.

Kationdannelse gjennom oksidasjon: $M + energi \rightarrow M^{\bullet+} + e^{-}$

Aniondannelse gjennom reduksjon: $M + e^{-} \rightarrow M^{\bullet-}$

hvor M står for et generelt organisk molekyl og \bullet indikerer at det er et radikal, at det inneholder et uparet elektron. Oksidasjon og reduksjon fører som oftest med seg forandringer i molekylets kjemiske sammensetning og elektronstruktur.

1.2 Aminosyrer og radikaler i aminosyrer

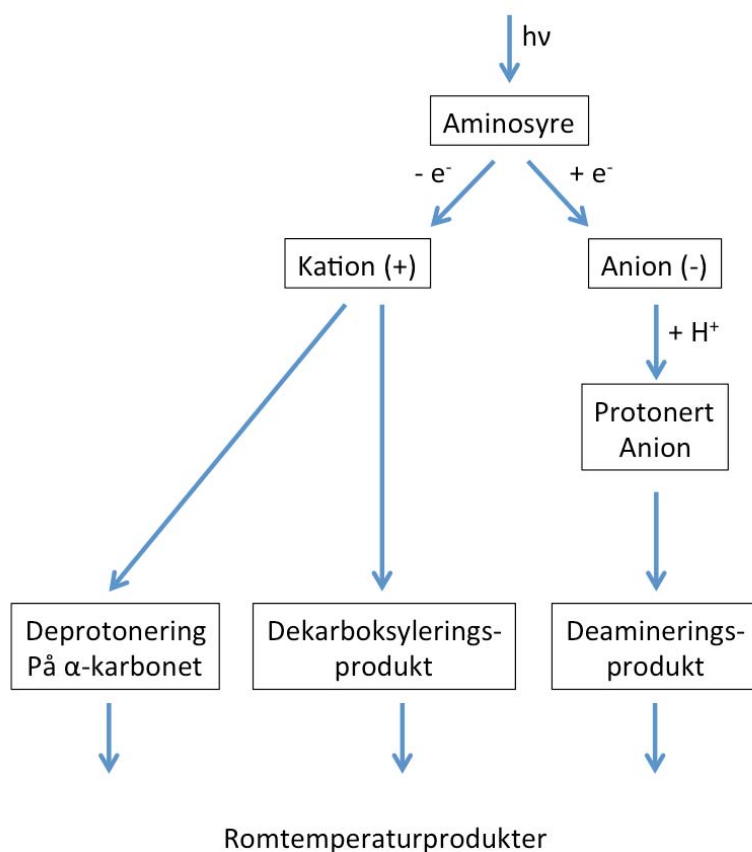
Menneskers DNA er i hovedsak lokalisert i cellekjernen. I det meste av tiden er DNA foldet rundt store proteinkomplekser, kalt *histoner* [4]. DNA vil foldes forholdsvis tettpakket rundt åtte histoner av gangen og dette komplekset kalles nukleosomer. Nukleosomene vil igjen foldes i en svært kondensert struktur som kalles kromatin, hvor disse strukturene tydelig kan observeres i cellekjernene ved hjelp av lysmikroskop. Det er i stor grad hydrogenbindinger som kobler DNA sammen med histonene [5].

Proteiner er bygget opp av aminosyrer. Alle aminosyrer har til felles et sentralt karbonatom som er bundet til en karboksylgruppe på den ene siden og en aminogruppe på den andre. Naturen benytter 20 forskjellige typer aminosyrer og det som skiller disse fra hverandre er sammensetningene av en sidekjede, som også er bundet til det sentrale karbonatomet. Sidekjedene betegnes ofte med R. De tre aminosyrene L-lysin, L-arginin og L-asparagin er gjennom sine karakteristiske sidekjeder blant de viktigste kontaktpunkter for vekselvirkning mellom proteiner og DNA i nukleosomene. Deres sidekjede inneholder en eller flere aminogrupper (NH_2) som er i direkte kontakt med sukker-fosfat kjeden i DNA-helixen gjennom hydrogenbindinger [5]. Radikaldannelse i disse aminosyrene kan dermed, gjennom forflytning av ladning og spinn, være knyttet til DNAs indirekte strålingsrespons [6-8]. Forflytning av ladning og spinn kan skje den ene eller den andre veien og aminosyrene,

eller histonene, kan derfor virke enten beskyttende eller sensitiverende overfor DNA med hensyn på dannelse av skader eller tilsvarende.

Figur 1-1 viser en generell reaksjonssekvens som illustrerer gangen for radikaldannelse i aminosyrer basert på studier av de aller enkleste aminosyrene L- α -alanin og α -glysin [9], hvor sidegruppene er henholdsvis $-\text{CH}_3$ og $-\text{H}$. Reaksjonssekvensen drives av termisk energi. For å eksperimentelt studere de aller første produktene i denne reaksjonssekvensen kan man derfor bestråle og utføre målinger ved lave temperaturer (ned mot flytende heliums kokepunkt, 4.2 K), hvor det er lite termisk energi tilgjengelig. Ved slike lavtemperaturstudier vil primærradikalene kunne analyseres. Dette omfatter spesielt dannelsen av anioner og kationer. Når det gjelder videre mekanismer så er det vanlig at anionet protoneres, og ved det ladningsnøytraliseres, fra omgivelsene og det henfaller vanligvis ved deaminering om tilstrekkelig termisk energi gjøres tilgjengelig. Kationet vil som regel ende opp som et dekarboksyleringsprodukt eller gi fra seg protonet bundet til aminosyrens sentrale karbon. De videre prosessene kan også forekomme ved lav temperatur, og dekarboksylering ofte ved meget lav temperatur. Ved oppvarming opp mot romtemperatur kan noen av lavtemperaturproduktene bevares, men ofte vil flere kjemiske prosesser drevet av termisk energi føre til dannelse av nye og stabile romtemperaturredikaler.

Aminosyrer med mer komplekse sidegrupper enn glysin og alanin har vært mindre undersøkt, og spesielt om radikaldannelse direkte i sidegruppen kan føre til reaksjonssekvenser kompetitive med de som er skissert i figur 1-1. Spesielt interessant er da de aminosyrene som bygger opp histonene i nukleosomene, i og med at eventuell radikaldannelse direkte i deres sidekjede er sentralt for spørsmålet om histonene påvirker strålingssensitiviteten til DNA gjennom ladnings- og elektronoverføringer.



Figur 1-1: Viser generell reaksjonsgang for radikaldannelse i aminosyrer basert på studier av L- α -alanin og α -glysin [9].

1.3 Metoder brukt i oppgaven

I denne masteroppgaven brukes "Electron Magnetic Resonance" (EMR) teknologi for å studere stråleinduserte molekylforandringer i en gitt aminosyre. EMR er en samlebetegnelse for flere teknikker, og i denne oppgaven er det spesifikt benyttet Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spektroskopi og dens assosierte teknikker Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) og ENDOR Induced EPR (EIE). EMR spektroskopi brukes for å studere paramagnetiske systemer. Som nevnt tidligere er et radikal paramagnetisk og har dermed et netto magnetisk moment forskjellig fra null. Dette magnetiske momentet vil vekselvirke med et ytre magnetfelt og denne vekselvirkningen resulterer i oppsplitting av spinnenergitilstandene for elektronene. Denne oppsplittingen vil også påvirkes av elektronets vekselvirkning med nærliggende atomkjernes magnetiske momenter. Dette er en effekt som kalles hyperfinvekselvirkning. Hyperfinvekselvirkningens egenskaper bestemmes av den elektroniske tilstandsfunksjonene og radikalets geometri.

Orienteringsavhengige hyperfinvekselvirkninger kan studeres ved å benytte EMR-spektroskopi med molekulære énkrystaller. En detaljert analyse av slike vekselvirkninger, sammen med kunnskap om systemets sammensetning, kan gi detaljert informasjon om elektronets tilstandsfunksjon og gjennom dette, detaljert informasjon om radikalets geometriske struktur.

Videre utføres molekylstrukturberegninger ved tetthetsfunksjonalteori, Density Functional Theory (DFT). I DFT benyttes optimalisering av elektrontetthetsfunksjonen til å bestemme radikalets geometri, og det beregnes teoretiske hyperfinvekselvirkninger for radikalet som direkte kan sammenlignes med eksperimentelle data. Ut fra eksperimentelt antatte radikalmodeller kan det pålegges spesifikke geometriforandringer i strukturen til systemet som studeres, og resultatene fra DFT-beregningene vil vise hvor godt den antatte radikalmodellen stemmer overens med de eksperimentelle observasjonene [10]. Molekylstrukturberegningene vil dermed enten underbygge eller svekke konklusjoner basert på de eksperimentelle resultatene. Mens DFT-beregninger for store organiske molekyler har vært tilgjengelig i flere ti-år [11] er det først de aller siste årene at det har vært mulig å utføre slike beregninger for organiske molekylsystem med periodiske grensebetingelser (Periodic Border Conditions, PBC) [12, 13]. DFT-beregninger med PBC er spesielt nyttig ved studier av krystalliske system, av den grunn av at disse er periodisk bygget opp. Ved DFT-beregninger på radikaler i krystaller medfører PBC at alle elektrostatiske og magnetiske påvirkninger fra radikalets omgivelser inkluderes [10]. Erfaringer viser at disse påvirkningene kan ha mye å si for de konklusjoner som kan trekkes fra DFT-beregninger [14].

1.4 Hensikt med oppgaven

Denne masteroppgaven går ut på å identifisere hvilke radikaler som dannes i én-krystaller av L-asparagin monohydrat (se molekylstrukturen i figur 3.2 i kapittel 3.1.1) ved en temperatur på 6 K. Krystallisert L-asparagin kjøles ned til denne temperaturen ved hjelp av flytende helium (4.2 K) og eksponeres for røntgenstråling slik at radikaler dannes. Som nevnt tidligere er de fleste kjemiske prosesser drevet av termisk energi, så ved å utføre eksperimentene med en temperatur på 6 K "fryses" systemet så det ikke er tilstrekkelig energi for å drive sekundære prosesser, og primærradikalene kan observeres. Kunnskap om primærradikalene som dannes i L-asparagin kan, i tillegg til å gi økt innsikt om generell radikaldannelse i komplekse aminosyrer, gi forståelse for dannelsesforløpet til de radikalene som kan

observeres eksperimentelt ved høyere temperaturer. Det er spesielt interessant å studere muligheten for eventuelle radikaldannelser i L-asparagins sidekjede, av den grunn av at L-asparagin er blant de aminosyrene som inngår i flest hydrogenbindinger med DNA i nukleosomene, og da i størst grad med DNA-basen adenin i tillegg til fosfat i sukker-fosfat kjeden til DNA [15].

Noen få studier av strålingsindusert radikaldannelse i L-asparagin er tidligere utført. Sevilla gjorde ved 77 K observasjoner som han knyttet til et mulig anion i aminosyrens amidgruppe [16] og Close m.fl. identifiserte ved romtemperatur et hydrogen-abstraksjonsradikal med spinnet lokalisert til sidekjeden av aminosyren [17]. Moulton og Coleman publiserte i 1984 et arbeid på radikaldannelse i L-asparagin ved 77 K ved å benytte EMR-spektroskopi [18], og Colemans doktorgrad fra 1985 utvidet dette studiet til temperaturintervallet 4.2 K og opp til romtemperatur [19]. Det ble rapportert om tre primærradikaler ved 77 K som også ble observert ved 4.2 K. Det første radikalet observert ble foreslått å være et anion, hvor spinnet var lokalisert til karboksylgruppen til L-asparagin, det andre radikalet et oksidasjonsprodukt hvor spinnet var plassert på aminosyrens sentrale karbonatom som en følge av dekarboksylering og det tredje nok et anionradikal, men med spinnet lokalisert til amid-enden i aminosyrens sidekjede. Til tross for at lavtemperaturreadikaler i L-asparagin ble foreslått, viser ikke disse arbeidene til tilstrekkelig detaljert underbyggende data-analyse. Det har gått 30 år siden dette arbeidet på L-asparagin ble utført, og en stor utvikling i EMR teknologi og sensitivitet har skjedd siden den gang. Moulton og Coleman hadde heller ikke tilgang til den meget nyttige teknikken EIE. EIE (under andre navn) ble første gang benyttet på lignende studier allerede i 1973 [20], men kom ikke i mer rutinemessig bruk før utover 1980-tallet [14]. I tillegg er molekylstrukturmodellering ved DFT en nyere metode som har gitt betydelig bidrag til å underbygge eller avkrefte tolkninger av eksperimentelle data. Denne oppgaven utføres derfor for å etablere L-asparagins lavtemperaturreadikaler på nytt og diskutere disse i forhold til Colemans resultater. Spesielt interessant er det å eventuelt bekrefte Colemans anion-radikal med spinnet lokalisert til aminosyrens sidekjede. Resultatene vil også sees i lys av andre relevante resultater i litteraturen, inkludert Knudtsens masteroppgave fra 2008 [21] som nylig, komplettert med DFT-beregninger, er innsendt for publisering [22].

2 Teori

I dette kapittelet presenteres teorien som er mest relevant for denne masteroppgaven. Først gis det en kort innføring i EMR-teori. Denne baserer seg på kapitlene 1-5 i Weil & Boltons *Electron Paramagnetic Resonance; Elementary Theory and Practical Applications* [23], kompendiet til Malinen & Sagstuen *FYS390- Elektron spinn resonans (ESR) spektroskopi* [24], samt forelesningsnotater i kurset FYS390. Deretter presenteres teorien bak molekylstrukturberegninger, som i hovedsak baserer seg på kapitlene 4, 6 og 8 i *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models* av Christopher J Cramer [25]. I tillegg vil ytterligere referanser henvises til direkte i teksten.

2.1 EMR

2.1.1 Magnetisk moment og Zeemanvekselvirkning

Både egenspinnet og banespinnet er avgjørende for en partikkels magnetiske egenskaper. Elektronets totale angulærmoment, \vec{J} , er definert ved

$$\vec{J} \equiv \vec{L} + \vec{S} \quad (2.1)$$

hvor \vec{L} er banespinnet og \vec{S} er egenspinnet, som begge har skarpe kvantetall. Elektronets totale magnetiske momentet er ut fra en klassisk beskrivelse gitt ved:

$$\vec{\mu}_J = \vec{\mu}_L + \vec{\mu}_S = -\frac{|e|\hbar}{2m_e} \vec{L} - g_e \frac{|e|\hbar}{2m_e} \vec{S} = -\frac{|e|\hbar}{2m_e} (\vec{L} + g_e \vec{S}) \quad (2.2)$$

hvor g-faktoren for et fritt elektron er lik $g_e \approx 2,0023$, m_e er elektronmassen, og $|e|\hbar$ er absoluttverdien av elementærladningen, $1,602 \cdot 10^{-19}$ C.

Et magnetisk moment $\vec{\mu}$ vil vekselvirke med et ytre, homogent magnetfelt \vec{B} . Dette kalles Zeemanvekselvirkning og resulterer i en magnetisk potensiell energi E_M gitt ved

$$E_M = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (2.3)$$

Et fritt elektron er uten banespinn, og det er dermed bare egenspinnet som er opphavet til det magnetiske momentet. Kvantemekanisk erstattes vekselvirkningsenergien med energioperatoren, Hamiltonoperatoren, og ligningen over kan skrives

$$\hat{\mathcal{H}}_{Zee} = -\vec{\mu}_s \cdot \vec{B} = g_e \frac{|e|\hbar}{2m_e} \vec{S} \cdot \vec{B} = g_e \beta_e B \hat{S}_z \quad (2.4)$$

hvor $\beta_e \equiv \frac{|e|\hbar}{2m_e}$ kalles Bohr-magnetonet, magnetfeltet er rettet langs z-retning $\vec{B} = B\vec{k}$, \hbar innføres for å få rett skalering [24] og spinnoperatoren regnes da som dimensjonsløs.

I det eksterne magnetfeltet, \vec{B} , vil elektronenes magnetiske energitilstand splittes ved at det magnetiske moment kan rette seg parallelt eller antiparallelt med feltretningen. Når Hamiltonoperatoren virker på egentilstander til elektronene, ψ , vil egenspinntilstandene da returnere egenverdiene $m_s = \pm \frac{1}{2}$:

$$\hat{\mathcal{H}}_{Zee}\psi = g_e \beta_e B \hat{S}_z \psi = g_e \beta_e B m_s \psi = \pm \frac{1}{2} g_e \beta_e B \psi = E_{Zee} \psi \quad (2.5)$$

Elektronet kan altså befinne seg i to mulige spinn egentilstander. I egentilstanden $|\alpha\rangle$ er spinnretningen parallelt, og dermed det magnetiske momentet antiparallelt, med magnetfeltet og har energi $E_\alpha = \frac{1}{2} g_e \beta_e B$. I egentilstanden $|\beta\rangle$ er spinnretningen rettet antiparallelt, og det magnetiske momentet parallelt, med magnetfeltet og har energi $E_\beta = -\frac{1}{2} g_e \beta_e B$. At magnetfeltet splitter energien opp i nivåer kalles for Zeeman-effekten.

Tilstanden $|\beta\rangle$ er den med lavest magnetisk potensiell energi. I et system med N frie elektroner vil det derfor, ut fra Boltzmannfordelingen, befinne seg flere elektroner i $|\beta\rangle$ tilstand enn i $|\alpha\rangle$ tilstand [24]:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} < 1 \quad (2.6)$$

der $N = N_\alpha + N_\beta$. Dette medfører at $N_\alpha < N_\beta$. Ved statiske forhold vil det altså være flere spinn som er rettet parallelt med det ytre magnetfeltet, noe som resulterer i en netto makroskopisk magnetisering i z-retning.

2.1.2 Resonansbetingelsen

Den magnetiske komponenten, \vec{B}_1 , av et elektromagnetisk felt kan indusere overganger mellom de to elektroniske Zeemannivåene. Det oscillerende magnetfeltet må ha en komponent vinkelrett på det statiske magnetfeltet for å kunne endre orienteringen av elektronets magnetiske moment, $\vec{B}_1 \perp \vec{B}$ [26]. Energidifferansen mellom de to Zeemannivåene er:

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = \frac{1}{2}g_e\beta_e B - \left(-\frac{1}{2}g_e\beta_e B\right) \quad (2.7)$$

$$\Delta E = g_e\beta_e B$$

Det elektromagnetiske feltet må ha en frekvens som motsvarer denne energidifferansen for å kunne indusere overganger mellom Zeemannivåene. Dette kalles *resonans* og resonansbetingelsen er dermed gitt ved:

$$h\nu = \Delta E = g_e\beta_e B \quad (2.8)$$

Fermis gylne regel [24] forteller at det er like sannsynlig å induserte overganger fra $|\alpha\rangle$ til $|\beta\rangle$ som fra $|\beta\rangle$ til $|\alpha\rangle$. Populasjonsdifferansen mellom Zeemannivåene vil da føre til en netto absorpsjon av energi, og at det dermed induseres flere overganger fra nivået med lav energi, $|\beta\rangle$, til nivået med høy energi, $|\alpha\rangle$. Det er denne netto energiabsorpsjonen som kan detekteres i EPR-spektroskopi. Ved en relativt liten effekt på det elektromagnetiske feltet vil ikke populasjonsdifferansen utjevnes, av den grunn av at det også vil forekomme spontane overganger som en følge av at systemet ønsker å gjenopprette sin likevektfordeling. Dette hindrer at systemet går i metning.

2.1.3 Hamiltonoperator for molekylært system

Eksperimentelt jobbes det med molekylære system og det uparede elektronet er dermed ikke fritt. Den fulle Hamiltonoperatoren for systemet er da gitt ved:

$$\hat{\mathcal{H}} = \hat{\mathcal{H}}_{Zee} + \hat{\mathcal{H}}_{Nzee} + \hat{\mathcal{H}}_{HF} + \hat{\mathcal{H}}_q + \hat{\mathcal{H}}_{ss} \quad (2.9)$$

De tre første leddene representerer henholdsvis elektron-Zeeman operatoren, kjerne-Zeeman operatoren (kjerne på engelsk: Nucleus) og hyperfinvekselvirknings-operatoren. Disse har relevans for denne oppgaven og utdypes derfor nedenfor. $\hat{\mathcal{H}}_q$ er Hamiltonoperatoren for kvadrupolkoblingen. Dette energileddet tar hensyn til at kjerner med spinn $I > \frac{1}{2}$ kan ha en ladningsfordeling som ikke er sfærisk symmetrisk. $\hat{\mathcal{H}}_{ss}$ er Hamiltonoperatoren for dipol-dipol-vekselvirkning mellom to elektron-spinn. I denne oppgaven studeres molekylære system der det ikke forekommer mer enn ett uparet elektron. $\hat{\mathcal{H}}_q$ og $\hat{\mathcal{H}}_{ss}$ utdypes derfor ikke ytterligere.

Elektron-Zeeman $\hat{\mathcal{H}}_{Zee}$

Zeemanoperatoren for det uparede elektronet i et molekylært system er lik:

$$\hat{\mathcal{H}}_{Zee} = \beta_e \vec{S} \hat{g} \vec{B} \quad (2.10)$$

hvor g_e er byttet ut med den anisotrope 2. rangs g-tensoren \hat{g} . Ettersom systemet ikke består av et fritt elektron, vil elektroner i tilstander høyere enn s-tilstanden, altså p, d, osv., også ha et banespinn, \vec{L} . Dette vil da bidra til det totale angulærmomentet, \vec{J} (se ligning 2-1), og gir et tilhørende totalt magnetisk moment som vist i ligning 2-2. Zeemanoperatoren blir da:

$$\hat{\mathcal{H}}_{Zee} = \beta_e (\hat{L}_z + g_e \hat{S}_z) B \quad (2.11)$$

For et spinn i et molekyl vil coulombvekselvirkninger i systemet føre til tap av symmetri og degenererte egentilstander opphører. Ikke-degenererte egentilstander kan skrives på reell form, og ettersom banespinnoperatoren er ren kompleks, vil forventningsverdien av banespinnets komponenter bli lik null:

$$E_{Zee} = \langle 0 | \hat{\mathcal{H}}_{Zee} | 0 \rangle = \beta_e B \langle 0 | \hat{L}_z | 0 \rangle + g_e \beta_e B m_s = g_e \beta_e B m_s \quad (2.12)$$

hvor $|0\rangle$ er grunntilstanden. Dermed har radikaler i molekylære omgivelser tilsvarende Zeemanenergi som et fritt elektron (se ligning 2.5).

På tross av at forventningsverdien for hvert av banespinnets komponenter er lik null for uparede elektroner i molekyler, observeres ikke g-verdien for et fritt elektron. Grunnen til dette er at det forekommer en svak vekselvirkning mellom elektronets egenspinnt og residuelt banespinnt. Dette gir en spinn-banekobling:

$$\hat{\mathcal{H}}_{SB} = \lambda \hat{L}^T \cdot \hat{S} \quad (2.13)$$

hvor λ er spinn-bane koblingskonstanten som bl.a. avhenger av atomnummeret til kjernen spinnnet tilhører. Det vil da observeres et g-faktorskift som har sin opprinnelse i felter satt opp av elektroner og kjerner i spinnets omgivelser. Denne effekten er retningsavhengig og dermed vil også g-faktoren være anisotrop. I og med at spinn-bane koblingen er liten, behandles den som perturbasjon og adderes til Zeemanoperatoren [23]. Dette fører til at Zeemanoperatoren må omformuleres til:

$$\hat{\mathcal{H}}_{Zee} = \beta_e \vec{S} \hat{g} \vec{B} \quad (2.14)$$

hvor \hat{g} er forskjellig fra g_e . Avviket i g-verdi fra g_e er liten og måles lettest ved høyere mikrobølgefrekvenser, som f.eks. ved Q-bånd² EPR. Analyser av \hat{g} kan gi informasjon om spinnnet og dets omgivelser. Analyser basert på \hat{g} -tensoren er ikke gjort i denne oppgaven, og en utdypende beskrivelse av \hat{g} -tensoren gis derfor ikke. For det systemet som er undersøkt i denne oppgaven er differansen ved X-bånd³ EPR liten og antagelsen om en isotrop \hat{g} er en god tilnærming.

Kjerne-Zeeman $\hat{\mathcal{H}}_{NZe}$

Kjerner har, som for elektronet, kvantisert spinn. Spinnkvantetallene for kjerner er kjent og tar verdiene $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots$. Analogt med elektronspinnnet gir kjernespinnet opphav til et magnetisk moment:

$$\vec{\mu}_N = g_N \beta_N \vec{I} \quad (2.15)$$

² Mikrobølgefrekvens rundt 35.0 GHz

³ Mikrobølgefrekvens rundt 9.5 GHz

hvor kjernemagnetonet er $\beta_N \equiv \frac{|e|\hbar}{2m_p}$ der m_p er protonmassen, og g_N er en konstant som er forskjellig for ulike kjerner og isotoper. I et ytre magnetfelt gir dette, som for elektronspinn, opphav til en magnetisk potensiell energi gitt ved:

$$E_N = -\vec{\mu}_N \cdot \vec{B} \quad (2.16)$$

Dette fører til at vi får et kjerne-Zeeman ledd i Hamiltonoperatoren gitt ved

$$\hat{\mathcal{H}}_{N_{zee}} = -\vec{\mu}_N \cdot \vec{B} = -g_N \frac{|e|\hbar}{2m_e} \vec{I} \cdot \vec{B} = -g_N \beta_N B \hat{I}_z \quad (2.17)$$

Når denne virker på en egentilstand gir den kvantisert energi lik

$$E_N = -g_N \beta_N B m_I \quad (2.18)$$

hvor $m_I = -I, -I+1, \dots, I$, og dermed antall kjernespinntilstander lik $2I+1$. For flere vekselvirkende kjerner er kjerne-Zeeman-termen gitt ved:

$$\hat{\mathcal{H}}_{N_{zee}} = -\sum_k g_{N,k} \beta_N \vec{I}_k \cdot \vec{B} \quad (2.19)$$

Hyperfinvekselvirkning $\hat{\mathcal{H}}_{HF}$

Det uparede elektronets vekselvirkning med kjerner i nærheten er opphav til en videre oppsplitting av energinivåene til elektronene. Dette kalles hyperfinvekselvirkning (heretter forkortet hfvv). Elektronene kvantiseres langs resultantfeltet av det magnetiske feltet fra nærliggende kjerner og det ytre magnetfeltet, og dette resultantfeltet vil variere med orientering [27]. Ettersom hfvv-ene er orienteringsavhengige og avstandsavhengige vil analyser av disse gi informasjon om plasseringen av nærliggende kjerner og uparet elektronspinn, og dermed radikalets geometri. Energioperatoren for hfvv mellom et spinn og en kjerne er gitt ved:

$$\hat{\mathcal{H}}_{HF} = \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} \quad (2.20)$$

$\hat{\mathbf{A}}$ er en 2. rangs tensor som opererer som en 3×3 - matrise og kalles hyperfinvekselvirkningstensen. Hfvv-en har både et isotropt og anisotropt bidrag:

$$\hat{\mathbf{A}} = A_0 \hat{\mathbf{1}}_3 + \hat{\mathbf{T}} \quad (2.21)$$

Den isotrope hyperfinvekselvirkningskonstanten, A_0 , har opphav i vekselvirkninger mellom elektronet og magnetfeltet på kjernens plass. Isotrop hfvv er i det enkleste tilfellet (for eksempel for H-atomet) gitt ved:

$$\hat{\mathcal{H}}_{iso} = \frac{2\mu_o}{3} g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2 \hat{S}_z \hat{I}_z = A_0 \hat{S}_z \hat{I}_z \quad (2.22)$$

hvor $|\psi(0)|^2$ er sannsynligheten per volumenhet for at elektronet befinner seg på kjernens sted og μ_o er permeabilitetskonstanten. For orbitaler med node på kjernens plass er $|\psi(0)|^2 = 0$ og disse vil dermed ikke bidra til den isotrope hfvv-en. For s-orbitaler er bølgefunksjonen sfærisk symmetrisk om kjernen og $|\psi(0)|^2 \neq 0$.

Elektronet vil også vekselvirke med dipolfeltet som settes opp av kjernens magnetiske moment. Dette er opphav til den anisotrope hfvv-en som varierer med magnetfeltets retning. Den potensielle energien i denne dipol-dipol koblingen kan ut fra en klassisk beskrivelse uttrykkes ved dipol-dipol Hamilton:

$$\hat{\mathcal{H}}_{dd} = \frac{\mu_o}{4\pi} g \beta_e g_N \beta_N \left(\frac{3(\vec{\mathbf{S}} \cdot \vec{\mathbf{r}})(\vec{\mathbf{I}} \cdot \vec{\mathbf{r}})}{r^5} - \frac{\vec{\mathbf{S}} \cdot \vec{\mathbf{I}}}{r^3} \right) \quad (2.23)$$

hvor r er avstanden mellom elektronet og kjernen. Denne Hamiltonoperatoren kan skrives om til:

$$\hat{\mathcal{H}}_{dd} = \vec{\mathbf{S}} \cdot \hat{\mathbf{T}} \cdot \vec{\mathbf{I}} \quad (2.24)$$

hvor $\hat{\mathbf{T}}$ er en 2. rangs tensor, men opererer som en matrise, og står for den anisotrope delen av $\hat{\mathbf{A}}$. Matriseelementene til denne symmetriske matrisen kan skrives:

$$T_{ij} = \mu_0 / 4\pi g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{3ij - r^2 \delta_{ij}}{r^5} \right\rangle \quad (2.25)$$

hvor hakeparenteser indikerer at det er integrert over den romlige elektrondistribusjonen. Symmetrien til s-orbitalene medfører at integralet over romdelen bli lik null, så det er kun høyere orbitaler som vil bidra til anisotrop hfvv.

Ut fra eksperimentelle dataopptak ved forskjellige orienteringer kan matriseelementene til hfvv-matrisen $\hat{\mathbf{A}}$ bli funnet ut fra:

$$\begin{aligned} A^2 = & (\mathbf{AA})_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + 2(\mathbf{AA})_{xy} \sin^2 \theta \cos \varphi \sin \varphi + (\mathbf{AA})_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \varphi \\ & + 2(\mathbf{AA})_{xz} \cos \theta \sin \theta \cos \varphi + 2(\mathbf{AA})_{yz} \cos \theta \sin \theta \sin \varphi + (\mathbf{AA})_{zz} \cos^2 \theta \end{aligned} \quad (2.26)$$

Vinklene svarer til magnetfeltets retning i forhold til de krystallografiske aksene; polarvinklene definert slik at θ er vinkelen $\vec{\mathbf{B}}$ danner med z-aksen og φ er vinkelen $\vec{\mathbf{B}}$ projisert ned i xy-planet danner med x-aksen. Det medfører at retningen til magnetfeltet i aksereferansesystemet er gitt ved koordinatene $(c_x, c_y, c_z) = (\sin \theta \cos \varphi, \sin \theta \sin \varphi, \cos \theta)$. Rotasjon om for eksempel z-aksen medfører at $\theta = 90^\circ$ og magnetfeltvektoren beveges i xy-planet. Dette fører da til, ut fra ligning 2.26, at komponentene $(\mathbf{AA})_{xx}, (\mathbf{AA})_{xy} = (\mathbf{AA})_{yx}$ og $(\mathbf{AA})_{yy}$ er tensorelementene som resulterer i disse målingene. Samling av data i alle de tre planene vil gi alle elementene i \mathbf{AA} -tensoren.

Numerisk diagonalisering av \mathbf{AA} -tensoren resulterer i de kvadrerte prinspalverdiene til hyperfinkoplingstensoren. Prinspalverdiene fåes da ved å ta roten av disse verdiene. Diagonaliseringen resulterer også i en egenvektormatrise $\hat{\mathbf{R}}$ som representeter rotasjonsmatrisen mellom krystalsystemet og prinspalakse-systemet. Prinspalaksene er spesifikke for vekselvirkningen mellom spinnet og den kjernen som hfvv-matrisen representerer og kan ofte relateres til spesifikke molekylære retninger. Egenvektormatrisen er felles for \mathbf{A} og \mathbf{AA} . Under diagonalisering vil trasen ikke endres, og trasen til \mathbf{A} vil derfor være summen av kvadratrøttene til prinspalverdiene til \mathbf{AA} . Elementene til hfvv-tensoren blir da på formen:

$$\begin{array}{ccc} a_{max} & 0 & 0 \\ 0 & a_{int} & 0 \\ 0 & 0 & a_{min} \end{array} \quad (2.27)$$

\hat{T} er traseløs, så den isotrope hfvv-konstanten kan bli funnet ved $A_0 = \frac{\text{trase}(A)}{3}$, se ligning 2.21. Den samlede energioperatoren for hfvv-er fra flere virkende kjerner er gitt ved:

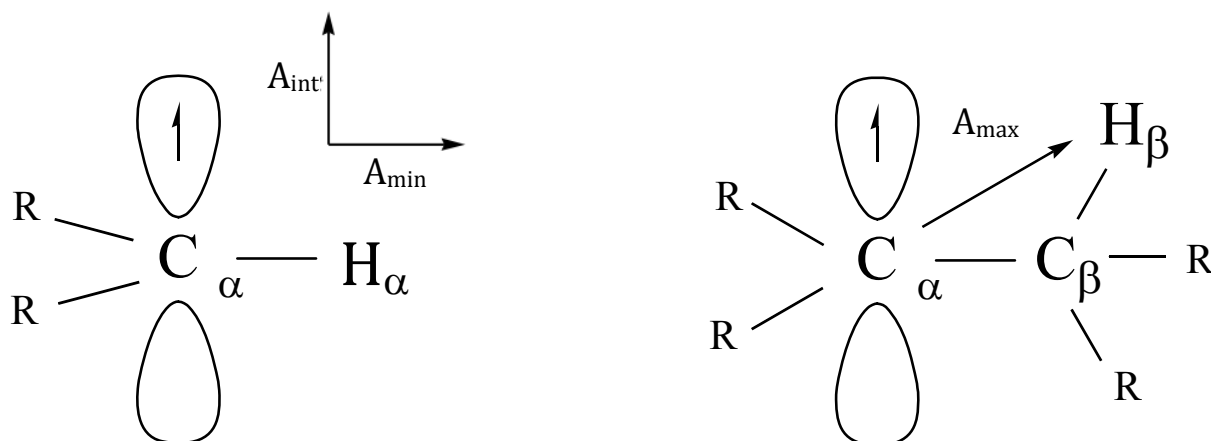
$$\hat{\mathcal{H}}_{HF} = \sum_k \vec{S} \cdot \hat{A}_k \cdot \vec{I}_k \quad (2.28)$$

2.1.4 Vekselvirkningsmodeller

Graden av anisotropi ved orientering i magnetfeltet kan forklares ved hjelp av ulike vekselvirkningsmodeller definert ut fra avstanden mellom atomet hvor spinnnet er lokalisert og kjernen den vekselvirker med, samt deres innbyrdes geometri. Radikalets uparede spinn vil vanligvis lokaliseres på karbon, og i oppgaven er det vekselvirkninger med protoner som studeres. Ordet ”kobling” brukes om en vekselvirkning mellom spinnnet og et spesifikt proton. Et spinn kan vekselvirke med flere kjerner og dermed gi opphav til flere koblinger, hvor hver kobling gir en hfvv-tensor. I det følgende presenteres to koblingsmodeller, α -kobling og β -kobling, som er basert på både teoretiske og empiriske resultater. Teorien i dette avsnittet baserer seg på kapittel 3.7, 5.6 og 5.7 i N.M. Athertons *Principles of Electron Spin Resonance* [27].

α -kobling

Opphavet til en α -kobling er et α -proton som er en hydrogenkjerne (et proton) bundet med en sigmabinding til det atomet som holder spinnnet, se figur 2-1. Avstanden mellom dem er ofte rundt 1 Å. I den vanlige modellen for denne vekselvirkningen er karbonatomet sp^2 hybridisert, og protonet ligger vanligvis i nodalplanet til 2p-orbitalet hvor spinnnet sitter (konvensjonelt 2p_z-orbitalet). Vekselvirkningen gir likevel både et isotropt og et anisotropt bidrag til hfvv-en.



Figur 2-1: Skissering av et α -proton og et β -proton. Bildet til venstre viser hvordan α -protonet er bundet en sigmabinding unna α -karbonet som holder spinnet, $C^\alpha - H(\alpha)$. Her vil hfvv-tensorens intermediære egenvektor være i retning av spinnorbitalen og den mest positive anisotrope hfvv-en (A_{\min}) være i retning av $C^\alpha - H(\alpha)$ bindingsretningen. Bildet til høyre viser hvordan β -protonet er lokalisert to sigmabindinger unna α -karbonet som holder spinnet, $C^\alpha - C^\beta - H(\beta)$. For denne koblingstypen vil retning av maksimal prinsipalverdi være parallell med $C^\alpha - H(\beta)$ retningen. Bildet er en editert utgave av figur 2-1 i masteroppgaven til Knudtsen fra 2008 [21].

Den isotrope hfvv-en, $a_{\alpha,iso}$, er proporsjonal med spinntettheten i $2p_z$ -orbitalen og er gitt ved McConnell-relasjonen [28]:

$$a_{\alpha,iso} = Q_{iso}^\alpha \rho^\pi \quad (2.29)$$

hvor ρ^π er spinntettheten i $2p_z$ -orbitalen og Q_{iso}^α er en konstant som blant annet avhenger av atomene som vekselvirker. Grunnen til at det oppstår en isotrop kobling med et α -proton bunner seg tilbake til 'spin-exchange' fenomenet; like spinn i forskjellige orbitaler har et negativt (attraktivt) bidrag i det totale energiregnskapet⁴, noe som ikke forekommer for ulike spinn i ulike rom-orbitaler. Dette fører til at bindingen $C^\alpha - H^\alpha$ polariseres. Det uparede elektronet vil 'trekke' elektronet i sigmabindingen med likt spinn nærmere seg, noe som fører til at α -protonet sitter igjen med et negativt spinnoverskudd i s-orbitalen. $|\psi(0)|^2$ i ligning 2.22 blir da forskjellig fra null, og α -protonet har opphav til en isotrop hfvv. Q_{iso}^α er negativ for α -koblinger, og dermed er også $a_{\alpha,iso}$ negativ. For et plant C-H system er en typisk verdi for Q_{iso}^α rundt -72 MHz [29].

⁴ Hunds regel: Høy multiplisitet gir lavere energi.

Den anisotrope hfvv-en med α -protonet skyldes en standard dipol-dipol vekselvirkning, se ligning 2.23. Integrasjon over spinnorbitalen medfører områder, relativt til retningen for det ytre magnetfelt, hvor vekselvirkningen har ulikt fortegn. Når magnetfeltets retning varieres, vil disse områdene i forhold til spinnorbitalen også variere. Med magnetfeltet rettet langs den intermediære prinsipalretningen, vil spinn tetthetsfunksjonen ligge ca. like mye innenfor det negative som innenfor det positive området. Dette resulterer i at den anisotrope komponenten blir liten. Ved de to andre prinsipalretningene, maksimum og minimum, vil nesten hele spinnorbitalen ligge innenfor det positive eller negative området, respektivt. For et ideelt sp^2 hybridisert karbonatom er absoluttverdiene av den største og minste dipolverdier typisk halvparten så stor som absoluttverdien av den isotrope koplingskonstanten. Dette fører dermed til at en α -koblings anisotrope bidrag er på formen $(\frac{|a_{iso}|}{2}, 0, -\frac{|a_{iso}|}{2})$. Den mest positive anisotrope hfvv-en for α -protonet er i $C^\alpha - H(\alpha)$ bindingsretningen og er relatert til spinn tettheten ved Bernhard/Gordy-relasjonen [29, 30]:

$$a_{\alpha, aniso} = Q_{aniso}^\alpha \rho^\pi \quad (2.30)$$

hvor ρ^π igjen er spinn tettheten i $2p_z$ orbitalet og Q_{aniso}^α er en konstant med verdi 38.7 MHz for et C-H fragment.

Den samlede hfvv-matrisen for en α -kobling er summen av den isotrope og den anisotrope vekselvirkningen og forventes derfor å være på formen $(-\frac{|a_{iso}|}{2}, -|a_{iso}|, -\frac{3|a_{iso}|}{2})$. Isotrop hfvv er i større grad sensitiv til avvik fra protonets plassering i nodalplanet til spinnorbitalen enn anisotrop hfvv [31]. Om beregninger av ρ^π ut fra ligning 2.29 og ligning 2.30 viser forskjell i verdi, tyder dette dermed på at det er bøyninger i bindingsstrukturen, og det er ρ^π gitt ved anisotrop beregning som er mest korrekt.

For α -koblinger vil den intermediære prinsipalretningen være retningen hvor magnetfeltet har samme orientering som spinnorbitalen. Ettersom denne retningen ofte er nær retningen til den bindingen som er brutt, kan den denne prinsipalretningen ofte sammenliknes med den krystallografiske retningen til den bindingen som er brutt.

β -kobling

Opphavet til en β -kobling er et β -proton som er en hydrogenkjerne lokalisert to sigmabindinger unna atomet som holder spinn tettheten, se figur 2-1. Avstanden mellom atomene er

da ofte i overkant av 2 Å. Et β -proton ligger ikke i nodalplanet til p-orbitalen hvor spinnet sitter, og det er derfor rom for direkte vekselvirkningseffekter. Spinnets vekselvirkning med disse kjernene kan også deles inn i et isotropt og et anisotropt bidrag.

Mekanismen som beskriver β -protonenes isotrope vekselvirkning er hyperkonjugasjon som er en beskrivelse av spinndelokalisering. Hyperkonjugasjon forklarer hvordan spinnet lokalisert en viss avstand unna kan gi opphav til uparet spinntetthet på β -protonets plass. Modellen viser at graden av delokalisering til protonet er avhengig av dihedralkvinkelen, θ , som er vinkelen som planet utspent av $C^\alpha - C^\beta - H(\beta)$ danner med planet definert av retningen til p-orbitalen og $C^\alpha - C^\beta$ bindingen. I tillegg til denne direkte overlappingen, vil også en liten grad av spinnpolarisasjon bidra til den isotrope hfvv-en for β -protoner. Den isotrope vekselvirkningen er gitt ved Heller-McConnell-relasjonen [32]:

$$a_{\beta,iso} = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho^\pi \quad (2.31)$$

hvor ρ^π er spinntettheten til det uparede elektronets orbital og hvor B_2 er knyttet til hyperkonjugasjonens bidrag, mens B_0 er bidraget fra spinnpolarisasjon som er liten og ofte neglisjerbar. Om β -protonet er bundet til et nitrogenatom er typiske verdier for konstantene $B_0 = 4.3 \text{ MHz}$ og $B_2 = 117.6 \text{ MHz}$ [33], og om det er bundet til et karbonatom er typiske verdier $B_0 = 0 \text{ MHz}$ og $B_2 = 126 \text{ MHz}$ [34].

Mekanismen bak β -protonets anisotrope vekselvirkning med spinnet er den samme som for α -protonet, men fordi dipol-dipol koblingen går som $\frac{1}{r^3}$ (se ligning 2.23) vil den anisotrope hfvv-en for et β -proton være mindre enn for et α -proton. Pga. den relativt store avstanden mellom spinn og kjerne for et β -proton, er punktdipolapproksimasjonen ofte en god tilnærming. Da forventes β -protonets anisotrope bidrag å være på formen $(2a_{\beta,aniso}, -a_{\beta,aniso}, -a_{\beta,aniso})$, hvor $a_{\beta,aniso}$ er gitt ved:

$$a_{\beta,aniso} = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \beta_e g_N \beta_N r^{-3} \rho^\pi \approx \frac{80 \rho^\pi}{r^3} \left[\frac{\text{MHz}}{\text{\AA}} \right] \quad (2.32)$$

For β -koblinger vil den isotrope komponenten oftest være dominerende, og den totale tensoren vil være nær aksialsymmetrisk på formen $(A_{\parallel}, A_{\perp}, A_{\perp})$. Retningen til egenvektoren

for den største prinsipalverdien, $A_{\parallel} = a_{max}$, vil være parallell med retningen mellom det karbon-atomet spinnen er lokalisert til og β -protonet. Avvik fra aksialsymmetri skyldes delvis at punktdipolapproximasjonen ikke er fullt ut oppfylt, og delvis at uparet elektronspinn kan være fordelt over flere kjerner som alle bidrar til den totale vekselvirkningen med et gitt proton.

2.1.5 EMR-spektroskopi

EMR eksperimenter kan lettest beskrives gjennom et forenklet system hvor ett elektron vekselvirker med en kjerne med spinn lik $1/2$, og hvor både g og A er isotrope. Hamiltonoperatoren for dette systemet er gitt ved:

$$\mathcal{H} = g\beta_e \mathbf{B} \cdot \mathbf{S} - g_N\beta_N \mathbf{B} \cdot \mathbf{I} + A\mathbf{S} \cdot \mathbf{I} \quad (2.33)$$

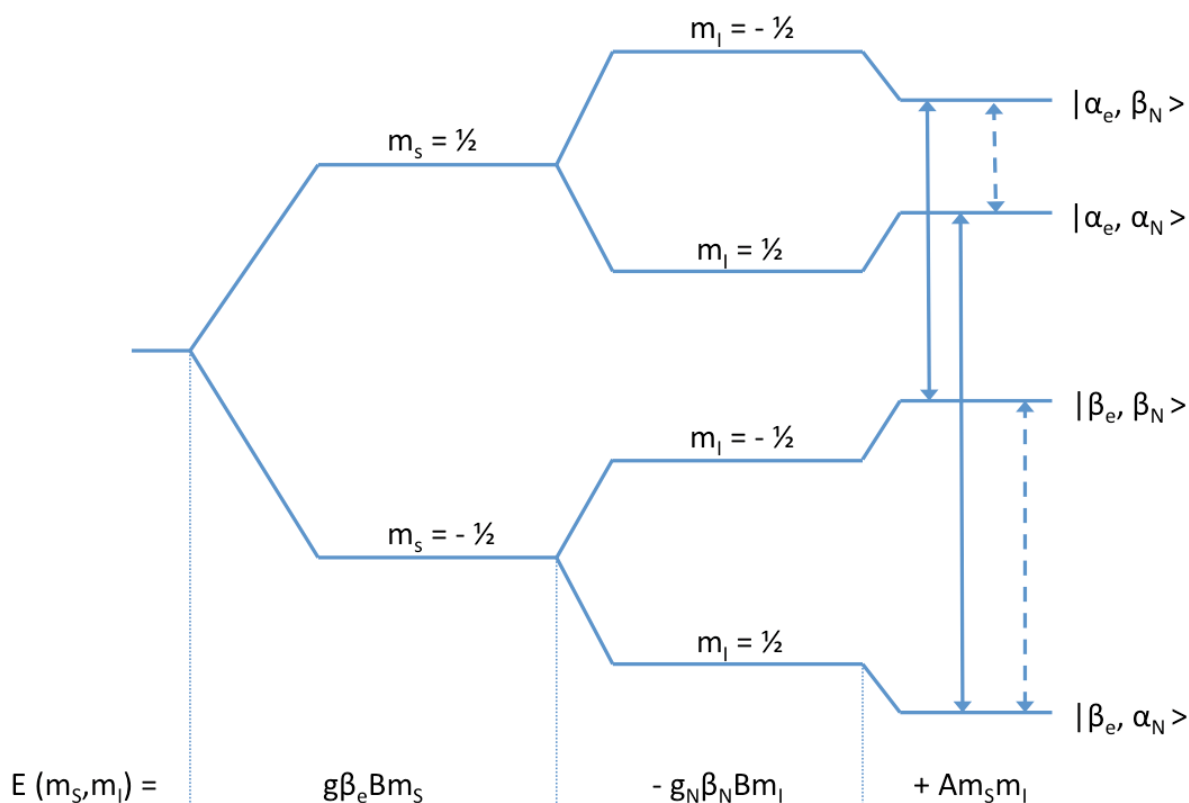
Med det eksterne magnetfeltet rettet langs z-retningen og Hamiltonoperatoren virkende på en tilstand $|m_S, m_I\rangle$, vil spinnoperatorene returnere de tilhørende egenverdiene og de resulterende energinivåene er gitt ved:

$$E_{m_S, m_I} = g\beta_e B m_S - g_N\beta_N B m_I + A m_S m_I \quad (2.34)$$

Ettersom både m_S og m_I i dette forenklede systemet har to mulige utfall, resulterer dette i de fire kombinasjonene $|\alpha, \alpha_N\rangle$, $|\alpha, \beta_N\rangle$, $|\beta, \alpha_N\rangle$ og $|\beta, \beta_N\rangle$. Disse fire svarer til fire forskjellige energinivåer vist i figur 2-2

EPR

Et EPR-spekter viser absorpsjonslinjer som skyldes overganger mellom to elektronspinn-tilstander. Som nevnt tidligere vil et ytre magnetfelt føre til en oppsplitting av elektronenes spinn-tilstander, noe som resulterer i to energinivåer. I EPR-spektroskopi er det av praktiske årsaker vanligst å variere magnetfeltet (konstant mikrobølgefrequens) for å oppnå resonans. Et mikrobølgefelt tilfører energi som vil kunne svare til energidifferansen mellom de to Zeemannivåene og spinnoverganger induseres. Ved EPR-overganger er det elektronenes



Figur 2-2: Energinivådiagram for et elektron som vekselvirker med en kjerne med spinn lik $1/2$. g -faktoren og hfvv-en A sees på som isotrope. A er positiv, og energinivådiagrammet er illustrert ut fra betingelsen $g_N \beta_N B > \frac{|A|}{2}$. Avstandene mellom linjene som splittes gjengir ikke realistiske energiforhold. Heltrukne pil representerer tillatte EPR-overganger, mens stiplet pil representerer tillatte ENDOR-overganger.

spinn som flippes mens kjernenes spinntilstand er uendret, og de karakteriseres derfor ved at $\Delta m_s = 1$ og $\Delta m_I = 0$. Det er kombinasjonen av mikrobølgeenergien og magnetfeltverdier medfører at resonansbetingelsen (ligning 2.8) oppfylles, og da at elektronspinn-overganger induseres.

De to mulige EPR-overgangene er merket med heltrukne piler i figur 2-2. For dette forenklete systemet kan de to magnetfeltverdiene som oppfyller EPR-resonansbetingelsen utledes fra ligning 2.34, og er gitt ved:

$$B_- = \frac{h\nu - \frac{|A|}{2}}{g\beta_e} \quad (2.35)$$

$$B_+ = \frac{h\nu + \frac{|A|}{2}}{g\beta_e} \quad (2.36)$$

hvor B_- er overgangen hvor $m_I = \frac{1}{2}$ og som skjer ved en lavere magnetfeltverdi enn B_+ hvor $m_I = -\frac{1}{2}$. EPR-spekteret viser følgelig to absorpsjonslinjer som funksjon av magnetfeltstyrken og de to like intense resonanstoppene vil plasseres med en avstand $\pm \frac{|A|}{2g\beta_e}$ fra feltverdien $B_0 = \frac{h\nu}{g\beta_e}$. For et spinn som vekselvirker med to kjerner hvor hver har $I = \frac{1}{2}$, vil hver av disse to absorpsjonslinjene da splittes opp i ytterligere to linjer. Mer avanserte kjemiske strukturer vil vanligvis ha mange og ofte små hfvv-er fra flere kjerner, og også fra flere typer radikaler. X-bånd EPR-spektre vil da være et resonansspekter hvor mange absorpsjonslinjer overlapper og hvor den resulterende resonanslinjen inneholder signaler fra flere koblinger fra forskjellige radikaler. Den avledende teknikken ENDOR-spektroskopi, brukes til å skille koblingene som overlapper i EPR-spekteret.

ENDOR

ENDOR er multippel resonansteknikk. Først fikseres magnetfeltet til en gitt EPR-resonanslinje, og deretter økes mikrobølge-effekten slik at EPR-overgangen (heltrukken pil i figur 2-2) delvis mettes. En EPR-overgang karakteriserer kjernespinntallet (enten $m_I = \frac{1}{2}$ eller $m_I = -\frac{1}{2}$). Deretter tilføres et radiobølgefelt (typisk i området 1 til 100 MHz) for å indusere overganger mellom kjernenes spinntilstander (stiplet pil i figur 2-2). Slike stimulerte overganger endrer populasjonen i tilstanden, som igjen påvirker intensiteten til den tilhørende EPR-overgangen. ENDOR-spekteret er et mål for denne endringen i EPR-linjens intensitet (amplitude) som en funksjon av radiobølgefrequensen som oppfyller forskjellige kjerners resonansbetingelser. Kjernespinne vil flippes mens elektronspinnenes retning er uendret, ENDOR-overgangene karakteriseres derfor ved at $\Delta m_S = 0$ og $\Delta m_I = 1$. I et komplekst EPR-spekter vil en EPR-resonanslinje være karakterisert av alle de kjernene som bidrar til linjen. Disse kjernene vil imidlertid oppleve resonans ved forskjellige radiobølgefrequenser fordi de har ulike hyperfinvekselvirkninger. Det vil altså detekteres endringer i EPR-linjens amplitude flere ganger når rf-feltet varieres fra en lav til høy frekvensverdi, og ENDOR-linjene vil da spres ut i ENDOR-spekteret som er en funksjon av radiofrekvensen. Spekteret består av mange resonanslinjer, hvor hvert par av linjer representerer en kobling mellom et spinn og et proton.

I figur 2-2 er ENDOR-overgangene tegnet ved betingelsen $g_N\beta_N B > \frac{|A|}{2}$. For å oppfylle resonansbetingelsen for kjernen, må radiobølgene som induserer overgangene ha en energi gitt ved enten:

$$h\nu_1 = g_N\beta_N B - \frac{|A|}{2}, \quad m_s = \frac{1}{2} \quad (2.37)$$

Eller

$$h\nu_2 = g_N\beta_N B + \frac{|A|}{2}, \quad m_s = -\frac{1}{2} \quad (2.38)$$

hvor $g_N\beta_N B/h$ kalles resonansfrekvensen til et fritt proton (siden vi ser på hydrogenkjerner i denne oppgaven). Denne er typisk rundt 15 MHz for X-bånd EPR. I ENDOR-spektret vil de to resonanslinjene plasseres $\pm \frac{|A|}{2h}$ i forhold til fri-proton frekvensen, og med lik intensitet. Dersom det for et gitt radikal er flere slike små vekselvirkninger med protoner som f.eks. er lokalisert langt ifra områder med høy uparet elektrontetthet, vil det være mange slike ENDOR-linjer i spekteret sentrert rundt fri-protonfrekvensen. Disse vil ofte overlappe med hverandre, fordi alle er sentret rundt den samme frekvensen, noe som gjør at de er vanskelige å skille fra hverandre.

Ved sterkere hfvv-er vil det siste leddet i ligning 2.34 være så stort at ved $m_s = \frac{1}{2}$ i figur 2-2 vil energinivåene til $|\alpha, \alpha_N\rangle$ og $|\alpha, \beta_N\rangle$ krysse hverandre. Betingelsen for dette er at $g_N\beta_N B < \frac{|A|}{2}$. Resonansbetingelsen for induerte overganger blir da:

$$h\nu_1 = \frac{|A|}{2} - g_N\beta_N B, \quad m_s = \frac{1}{2} \quad (2.39)$$

$$h\nu_2 = \frac{|A|}{2} + g_N\beta_N B, \quad m_s = -\frac{1}{2} \quad (2.40)$$

Dette gir to absorpsjonslinjer sentret ved $\frac{|A|}{2h}$ og med en avstand på $2 \cdot g_N\beta_N B/h$ fra hverandre i ENDOR-spekteret. Når denne betingelsen er oppfylt vil resonanslinjene fra alle koblingene som bygget opp EPR-resonanslinjen, pga. ulike A-verdier, plasseres ulikt i spekteret. De sentreres ikke rundt den samme frekvensen, og blir dermed spredd utover i ENDOR-spekteret.

Det er disse linjene som er eksperimentelt lettest å måle, og de er dermed opphav til de analysene som gjøres i denne oppgaven.

EIE

EIE er en dobbeltresonansteknikk, hvor en i motsetning til i ENDOR holder mikrobølge – og (i prinsippet) radiobølgefrequensen konstant mens magnetfeltet varieres gjennom resonansbetingelsene. Et EIE-spekter viser hvordan en ENDOR-linjes amplitude endres som en funksjon av induerte EPR-overganger som funksjon av magnetfeltet.

Ved opptak av et EIE-spekter tas det først et EPR-spekter, og et ENDOR-spekter som beskrevet ovenfor. Så låses radiofrekvensen i ENDOR-spekteret ved en gitt ENDOR-resonanslinje (som representerer en spesifikk kobling for et spesifikt radikal). Deretter lar man det ytre magnetfeltet variere slik man gjør ved et EPR-opptak. Når magnetfeltet varieres ved EPR-opptaket, må radiofrekvensen for den gitte ENDOR-resonanslinjen endres i takt med magnetfeltet slik at ENDOR-resonansbetingelsen hele tiden holdes oppfylt (siden $h\nu_2 = \frac{|A|}{2} \pm g_N\beta_N B$). Når magnetfeltet endres vil elektronspinnene oppleve resonans og det vil skje en endring i populasjonen til spinnstilstandene. Dette påvirker i sin tur den ENDOR-overgangen rf-feltet er 'låst' til. EIE-spekteret viser hvordan ENDOR-linjen opplever denne endringen. Et EIE-spekter fungerer på en måte som et EPR-spekter, men inneholder bare resonanslinjene fra alle koblingene som er assosiert til ett radikal i prøven. Følgelig vil alle ENDOR-linjer som er et resultat av vekselvirkninger med samme radikal ha like EIE-spektre. Grunnen til dette er at alle kjerner som er koblet til samme spinn vil splittes opp ut fra samme energinivådiagram (lignende figur 2-2). Ved å la radiobølgefrequensen varieres i takt med magnetfeltverdien, vil en hele tiden "holde seg på" en gitt ENDOR-linje og det er altså bare et radikal som opplever resonans. Av tekniske årsaker (magnetfeltet er ikke modulert, mens ENDOR-frekvensen er frekvensmodulert) er EIE-spekteret et absorpsjons-liknende spekter. Sammenligning av ulike koblingers EIE-spektre er til stor hjelp ved analysering av hvilke koblinger som kommer fra samme spinn, og dermed fra samme radikal. I tillegg vil parameterinnstillinger under opptak av EIE-spektre indikere om det er en høyfrekventgren eller en lavfrekventgren i ENDOR-spekteret opptaket er gjort ved.

Mens et EPR-spekter gir kvantitativ informasjon gjennom de relative intensitetene til EPR-linjene, vil et EIE-spekter ikke gi den informasjonen. Grunnen til dette er at EIE-spekteret er tatt opp med høy mikrobølge-effekt og er derfor delvis mikrobølge-mettet. EIE er også, likt

som for ENDOR, i stor grad avhengig av de ulike kjernenes forskjellige relaksasjonsforhold, noe som påvirker EIE-resonanslinjenes intensiteter. Dette medfører i at EIE-spektrene ofte har brede ‘absorpsjonslinjer’ med ikke-informative relative intensiteter, men linjeposisjonene vil likevel være reproducerbare i den grad det observeres EIE-linjer.

2.2 Molekylstrukturberegninger

En sammenligning av eksperimentelle data med data fra kvantemekaniske beregninger kan forsterke eller svekke de eksperimentelle konklusjonene. Beregninger på kvantemekaniske systemer gjøres som en iterativ prosess hvor det, gjennom geometrioptimeringer, forsøkes å minimere systemets potensielle energi. En stabil struktur svarer til et lokalt minimum for den potensielle energien. I tetthetsfunksjonalteori (på engelsk: Density Functional Theory, DFT) brukes beregninger av elektrontettheten ved hver geometri for å nærme seg dette minimumet.

2.2.1 MO-teori

Ethvert kjemisk system har en tilhørende bølgefunksjon, Ψ . I molekylorbital (MO) teori representeres bølgefunksjonen gjennom MOer som bygges opp av lineærkombinasjoner av atomorbitaler (AOer). Bølgefunksjonen returnerer informasjon om systemet når passende operatorer virker på den, og Hamiltonoperatoren er den som henter ut systemets energi. Når denne virker på bølgefunksjonen resulterer dette i den kvantemekaniske Schrödinger-ligningen:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.41)$$

Bølgefunksjonen er en funksjon av elektronenes tre romlige koordinater og deres spinn. For et molekylært system bestående av N elektroner vil dermed elektronstrukturen variere med 3^N romlige variabler i tillegg til elektronenes spinn, noe som for større systemer enn hydrogenatomet ikke lar seg løse analytisk. Det har derfor blitt utviklet flere metoder som finner energien numerisk.

Hartree-Fock Self Consistent Field (SCF) er en av de mest brukte metodene innen MO- teori. SCF metoden går ut på at hvert elektron vekselvirker med et statisk felt som representerer exchange og frastøtningseffekter satt opp av alle de andre elektronene. Én-elektronoperatorer brukes i en iterativ prosess hvor vekting av orbitalkoeffisienter for hver

MO forbedres, frem til ønsket konvergens for SCF er nådd. Hartree-Fock SCF tar ikke hensyn til elektronkorrelasjon. I Hartree-Fock SCF tilnærmes den totale grunntilstandsbølgefunksjonen som et produkt av én-elektronbølgefunksjoner. Beregningen av exchange-delen av energien er en svært tidskrevende operasjon.

2.2.2 DFT

DFT benytter elektrontettheten, som kun er en funksjon av tre romlige koordinater (ikke 3^N slik som bølgefunksjonen), til å beregne exchange og korrelasjon mellom elektronene effektivt, mens resten av energien regnes ut ved å benytte bølgefunksjonen. Motivasjonen for å velge DFT er å finne energien uten å løse Schrödinger-ligningen eksplisitt, og dermed unngå bølgefunksjonens avhengighet av mange variabler som er tidskrevende ved exchange-beregninger. I tillegg til at DFT-beregninger som oftest er mer beregningseffektive enn ved Hartree-Fock metoden, vil de også være sikrere ved beregninger på spinnsystemer (*Cramer* [25], s 272), og de inkluderer elektronkorrelasjon.

Hamiltonoperatoren som returnerer systemets energi avhenger, i motsetning til bølgefunksjonen, kun av antall elektroner og kjernenes posisjoner. Ideen er derfor å kunne beregne energi ut fra kun elektrontettheten, ρ_0 . Tettheten er kun en funksjon av posisjon, og antall elektroner er gitt ved:

$$N = \int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.42)$$

Hamiltonoperatoren blir representert gjennom energifunksjonaler⁵ med elektrontettheten som inngang.

Hohenberg og Kohns to teoremer [35] er essensielle for DFT. Eksistensteoremet forteller at elektrontettheten vil gi en entydig grunntilstandsbølgefunksjon Ψ_0 . Dette betyr at elektrontettheten i prinsippet inneholder all informasjon om systemet. Det andre teoremet forteller at elektrontettheten oppfyller variasjonsprinsippet; elektrontettheten ved grunntilstanden gir lavere energi enn elektrontettheter ved alle andre tilstander.

⁵ En funksjonal er en funksjon av en funksjon

$$E_{\rho} \geq E_{\rho_0} \quad (2.43)$$

Dette gir rom for å sammenlikne forskjellige elektronstrukturer, hvor den med lavest tilhørende energi er den beste tilnærmingen av elektrontettheten ved grunntilstanden.

2.2.3 Basissett

I praktisk Kohn-Sham DFT [36] brukes både bølgefunksjon og elektrontetthet til å beregne systemets energi. Elektrontettheten er en sum av én-elektrontettheter. Disse vil, i likhet med i de i MO-teori, uttrykkes ved et sett av basisfunksjoner. Å finne den optimale vektingen av hver basisfunksjon (bestemme orbitalkoeffisientene) er en iterativ SCF prosess. Basissett som brukes i både DFT og MO-teori baseres på det samme. Basisfunksjonene er matematiske funksjoner som ønskes på en kjemisk fornuftig form i tillegg til en beregningseffektiv form. Beregningene blir mer *effektive* dersom det trengs færre funksjoner for å beskrive hvert MO. Beregningseffektive basisfunksjoner har i tillegg en form som gjør at integralberegninger går raskt. En funksjon som representerer et AO er på en *kjemisk fornuftig* form om funksjonen sentreres på et atom og har en form som ligner egentilstandene til hydrogenatomet, ettersom det er kjent at de vil være svært like løsningene for større atomer. Om funksjonene er kjemisk fornuftige vil de kreve færre basisfunksjoner for å bygge opp elektronstrukturen, og dermed også være beregningseffektive.

I tidlig MO-teori ble Slater Type Orbitals (STO) utviklet som basisfunksjoner:

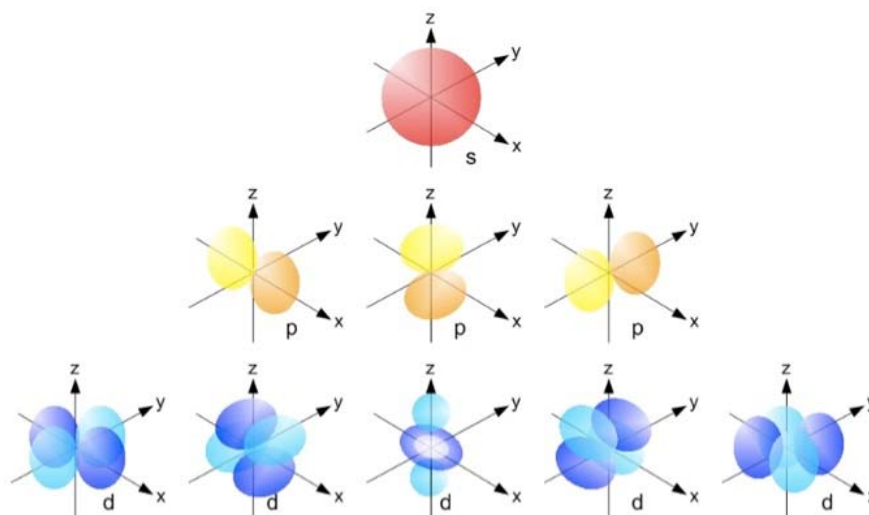
$$\varphi_{STO} \sim e^{-\xi r} \quad (2.44)$$

hvor φ_{STO} også er vinkelavhengig for å kunne representere orbitaler med ulikt angulærmoment. STO basisfunksjonene har en god kjemisk form fordi de har samme radielle avhengighet som hydrogenorbitalene. Men ulempen med disse er at noen ledd i energiberegningene ikke lar seg løse analytisk med disse som basissett, og de er beregningsmessig ikke effektive. Gaussian Type Orbitals (GTO) ble foreslått som et beregningseffektivt alternativ til STO. Med dette basissettet kan energiberegningene løses analytisk fordi den radiale avhengigheten følger gaussisk form:

$$\varphi_{GTO} \sim e^{-\xi r^2} \quad (2.45)$$

hvor φ_{GTO} også er en funksjon av vinkel. Ulempen med GTO er at den ikke representerer hydrogenorbitalene godt. I et Contracted Gaussian Form (CGF) basissett bygges approksimasjoner av STO opp ved lineærkombinasjoner av GTO. På denne måten oppnås både beregningseffektiv matematikk og kjemisk fornuftig radialavhengighet i basissettene. Ulike CGF basissett kombinerer ønsket om et lavt antall GTO for å effektivisere beregningene sammen med ønsket om bruke tilstrekkelig mange for å gjenskape den matematiske formen til STO. Graden av kontraksjon handler om hvor mange primitive GTO som er brukt for å bygge opp hver STO.

Basisfunksjonene representerer, i tillegg til radial avhengighet, også vinkelavhengighet. Et orbital er en matematisk funksjon som beskriver sannsynligheten for å finne atomiske elektroner i forskjellige områder rundt kjernen, se figur 2-3 hvor de tre nivåene med lavest angulærmoment (s, p, d) er illustrert. s-orbitalet er kulesymmetrisk, mens alle orbitalene med høyere angulærmoment har forskjellige retninger i rommet. Elektronets plassering i et orbital karakteriseres av energikvantetallet, samt verdien og retningen av angulærmomentet, og det kan maksimalt være to elektroner i hvert orbital.



Figur 2-3: Illustrasjon av de tre nivåene med lavest angulærmoment; s (rødt), p (gult) og d (blått). Alle orbitaler over s-orbitalet har retninger i rommet. Figuren er en tilpasset figur hentet fra ChemWiki [37].

Et eksempel på basissett er Triple Zeta Valence Polarised (TZVP) [38]. Her representeres hvert valensorbital ved tre basisfunksjoner som hver er på CGF, altså bygd opp av forskjellige lineærkombinasjoner av gaussiske basisfunksjoner. Valensorbitalene i molekyler vil variere med bindingstype, så disse bygges derfor opp av flere basisfunksjoner for å øke fleksibiliteten. Kjerneorbitalene representeres her kun ved én kontrahert basisfunksjon. TZVP basissettet inneholder også en polarisasjonsfunksjon for hvert orbital. Polarisasjonsfunksjonen er en basisfunksjon som har et kvantetall med høyere angulærmoment enn valensorbitalene. For eksempel for hydrogen hvor 1s-orbitalene er valensorbital er det lagt til en basisfunksjon for et p-orbital, og for karbon hvor 2p-orbitalene er valensorbitaler er det lagt til en basisfunksjon for et d-orbital.

Et alternativ til atomsentrerte basisfunksjoner, som STO og GTO, er en basis av *plane bølger*. Dette vil være særdeles nyttig dersom systemet som beskrives er periodisk, av den grunn av at plane bølger er periodiske av natur og at beregninger kan foretas i fourierrommet. Gaussian and Plane Waves (GPW) og Gaussian and Augmented Plane Waves (GAPW) er to mye brukte metoder hvor basissettene er satt sammen av gaussiske orbitaler og plane bølger. Det som skiller metodene er måten de beskriver elektrontettheten på, samt at GPW benytter pseudopotensialer (beskrives nedenfor) mens ved GAPW kan en velge å beskrive alle elektronene eksplisitt.

GPW [39] er en hybridmetode hvor to typer basisfunksjoner benyttes; et gaussisk basissett for å beskrive bølgefunksjonen/orbitalene, og plane bølger for å beskrive tettheten. Ved å la plane bølger beskrive periodiske systemer blir beregningene effektive. Ved GPW brukes atomiske pseudopotensialer, som er et effektivt potensial som beskriver atomkjernene og de innerste elektronene. Dette er en god beskrivelse i og med at de fleste kjemiske vekselvirkninger kun involverer valenselektronene, men fravær av de innerste elektronene fører til at beregninger av hfvv-tensorer blir unøyaktige.

I GAPW [40] tas det også i bruk gaussiske funksjoner for å representere orbitalene og plane bølger for å beskrive elektrontettheten, men GAPW benytter ikke kun plane bølger for å uttrykke elektrontettheten. Det benyttes utvidede plane bølger (på engelsk: augmented plane waves) som er bygget opp av gaussiske funksjoner i tillegg til de plane bølgene. Rundt atomkjernene vil det være stor variasjon i elektrontettheten, så disse områdene er beskrevet ved flere lokale, sfæriske funksjoner som ikke overlapper. Mellom atomkjernene vil tettheten være jevn og variere lite, så disse mellomregionene representeres ved plane bølger. Ved å

ikke la områder med stor variasjon i elektrontettheten bli beskrevet ved plane bølger, reduseres antall plane bølger som behøves, noe som gjør metoden mer effektiv. I GAPW kan en i tillegg velge å også inkludere kjerneelektronene i beregningene. Dette er nødvendig for å beregne gode hfvv-tensorer.

2.2.4 Energifunksjonal

Kohn-Sham DFT [36] er en metode for å praktisk implementere DFT i energiberegninger. I Kohn-Sham DFT konstrueres Hamiltonoperatoren for et system av ikke-vekselvirkende elektroner i et effektivt potensial; et fiktivt system. I det effektive potensialet inngår coulombvekselvirkninger mellom elektronet og den totale tettheten, samt det eksterne potensialet som består av den elektriske tiltrekningen fra atomkjernene. Det antas at dette fiktive systemet har samme elektrontetthet som det virkelige systemet hvor elektronene vekselvirker direkte. Energifunksjonalen, som er en funksjon av elektrontettheten, deles inn i komponentene:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T_{i-vv}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ek}[\rho(\mathbf{r})] + V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] + \Delta T[\rho(\mathbf{r})] + \Delta V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] \quad (2.46)$$

De tre første leddene på høyre side representerer henholdsvis kinetisk energi for et ikke-vekselvirkende system, potensiell energi mellom elektroner og kjerner, og den klassiske frastøtningen mellom elektronene. Disse leddene er en sum av hvert elektrons bidrag, og representeres ved Hamiltonoperatoren i det fiktive systemet virke på bølgefunksjonen på samme måte som ved MO-teori.

De to siste leddene på høyre side i ligning 2.46 representerer henholdsvis korleksjon i kinetisk energi ved at vi faktisk har et vekselvirkende system og korleksjoner for å anta at elektronfrastøtningene er klassiske og ikke kvantemekaniske. Disse to leddene settes ofte sammen i et ledd som kalles *exchange-correlation energi*, E_{xc} . Det er dette leddet som i DFT beskrives gjennom elektrontettheten.

For å finne energien til systemet hvor elektronene vekselvirker, er kunnskap om E_{xc} som en funksjon av tettheten nødvendig. Utfordringen i DFT er å modellere den ukjente exchange-korrelasjons energien. Om denne var kjent, hadde DFT gitt den eksakte energien til systemet, men dessverre vil dette leddet føre til at også DFT er en tilnærming.

E_{xc} representeres gjennom funksjonaler. Det er vanlig å uttrykke den som en interaksjon mellom elektrontettheten $\rho(\mathbf{r})$ per enhet volum og energitettheten $\varepsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$ per partikkeltetthet

$$E_{xc}[\rho(\mathbf{r})] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}[\rho(\mathbf{r})] d\mathbf{r} \quad (2.47)$$

Den enkleste måten å tilnærme E_{xc} på er ved Local Density Approximation som bygger på energiberegninger for en uniform elektrongass. Her kalkuleres energitettheten ut fra kun elektrontettheten i de forskjellige posisjonene. Men tettheten er som regel ikke uniform. E_{xc} er ofte også avhengig av endring i tetthet i et punkt, $\nabla\rho(\mathbf{r})$, og ikke bare tettheten, $\rho(\mathbf{r})$. Tilnærminger som tar hensyn til dette kalles Generalised Gradient Approximation (GGA). Det er utviklet flere slike GGA funksjonaler, ofte ut fra empiriske resultater i tillegg til teori. En mye brukt GGA funksjonal er BLYP hvor "B" er exchange funksjonal, utviklet av Becke [41] og «LYP» er korrelasjonsdelen utviklet av Lee Yang og Parr [42]. Exchange-delen er basert på både teori og empiriske resultater, mens korrelasjonsdelen er kun empirisk basert. De to delfunksjonalene brukes også i kombinasjon med andre funksjonaler.

3 Metode

Dette kapittelet tar for seg korte beskrivelser av de eksperimentelle metodene benyttet i dette studiet. Utvalgt teori rundt noen av teknikkene og fenomenene er i hovedsak hentet fra *Biophysics, An Introduction* av C. Sybesma [43] (spesielt kapittel 3.7) og N.M. Athertons *Principles of Electron Spin Resonance* [27] (spesielt kapittel 1.9 og 4.3).

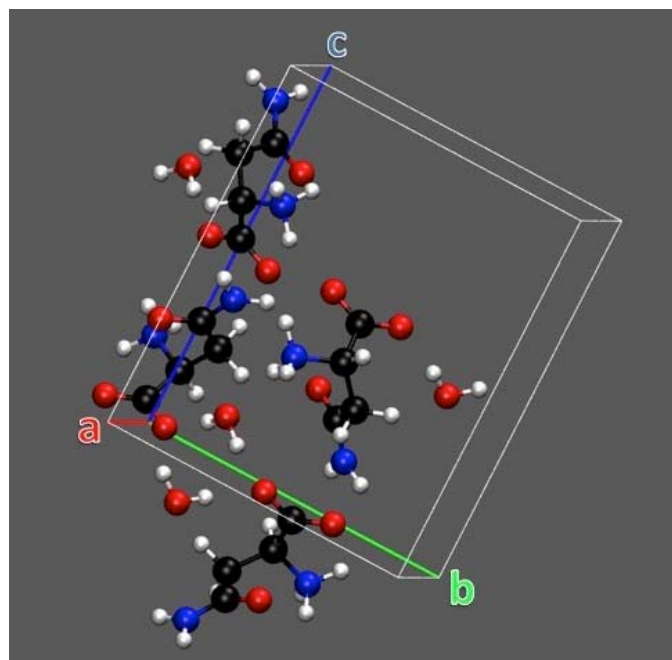
3.1 EMR

3.1.1 Krystallisering av L-asparagin

For å analysere radikaldannelser i L-asparagin monohydrat (heretter: L-asparagin) ved EMR-spektroskopi må molekylene helst ordnes på en fullstendig systematisk måte. En énkrystall er en strukturert samling av atomer eller molekyler, og bygges opp av *enhetsceller*. En enhetscelle er den minste delen av en krystall som fremdeles inneholder alle dens egenskaper. En enhetscelle karakteriseres ved tre krystallografiske akser; $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ (heretter: akser) og ved vinklene som disse aksene danner med hverandre. Det finnes sju generelle typer krystallsystem eller enhetsceller.

I L-asparagin er alle vinklene mellom aksene 90° , og alle aksene har ulik lengde. En slik enhetscelle kalles *ortorombisk*. L-asparagins enhetscelle har akselengder lik $\langle a \rangle = 5.593 \text{ \AA}$, $\langle b \rangle = 9.827 \text{ \AA}$ og $\langle c \rangle = 11.808 \text{ \AA}$ og inneholder fire asymmetriske enheter, hvor hver består av ett L-asparaginmolekyl og ett vannmolekyl [44] (se figur 3-1). Disse fire asymmetriske enhetene er relatert gjennom rotasjonssymmetri gitt ved romgruppen $P2_12_12_1$, som betyr at hver av celleaksene er en to-tallig symmetriakse. Symmetrioperasjonene vises i tabell 3-1.

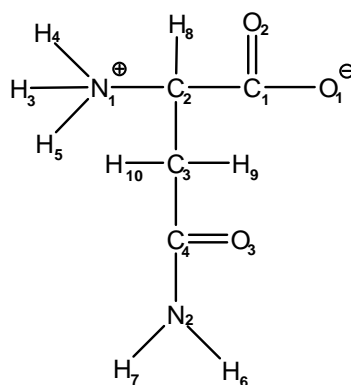
Hvert L-asparaginmolekyl knyttes til sine molekylære omgivelser gjennom 11 hydrogenbindinger, hvor sju av dem er forskjellige. Skjematisk skissering av 2D-strukturen til L-asparagin sammen med nummereringen av atomene i som er brukt i denne oppgaven er vist i figur 3-2.



Figur 3-1: Illustrasjon av enhetscellen til L-asparagin. Enhetscellen har akselengder $\langle a \rangle = 5.593$ Å, $\langle b \rangle = 9.827$ Å og $\langle c \rangle = 11.808$ Å, vinklene mellom hver akse er 90° og den inneholder fire asymmetriske enheter. Svarte atomer viser karbon, blå atomer viser nitrogen, røde atomer viser oksygen og sølvfargede atomer viser hydrogen.

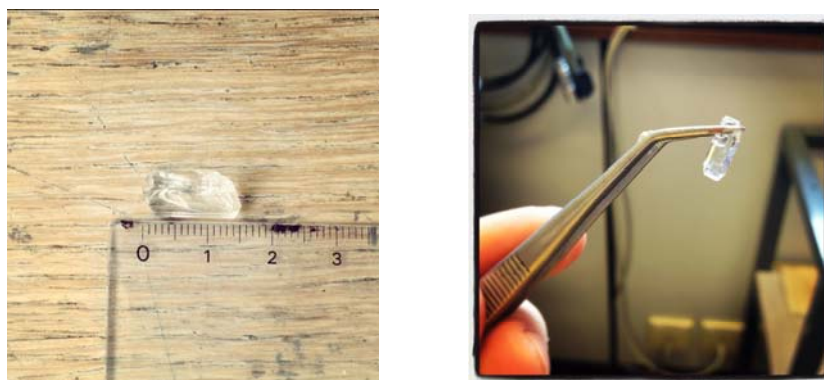
Tabell 3-1: Symmetrioperasjonene mellom asymmetriske enheter for enhetscellen til L-asparagin. Enhetscellen inneholder fire asymmetriske enheter. Et asymmetrisk enhet består av et asparaginmolekyl og et vannmolekyl [44].

Kompleks 1	x	y	z
Kompleks 2	$\frac{1}{2} - x$	- y	$\frac{1}{2} + z$
Kompleks 3	$\frac{1}{2} + x$	$\frac{1}{2} - y$	- z
Kompleks 4	- x	$\frac{1}{2} + y$	$\frac{1}{2} - z$



Figur 3-2: Skjematisk 2D-struktur og nummerering i henhold til Verbist m.fl [44] for atomene i L-asparagin. H₂O-atomene som inngår i den asymmetriske enheten vises ikke i figuren, men er nummerert O₄, H₁ og H₂.

For å gro krystaller ble L-asparaginpulver (*Sigma-Aldrich*) blandet med destillert vann til en mettet løsning ved 50 °C. Løsningen ble fordelt i små glass hvor åpningen ble dekket av parafilm med tre til fire hull i for å senke fordampningsraten, og plassert i et varmeskap som holdt samme temperatur som løsningen. Over en varierende tidsperiode, ofte på noen uker, fordampet vannet sakte og L-asparaginkrystaller av forskjellige størrelser og kvaliteter ble dannet (se figur 3-3). Heretter vil L-asparaginkrystaller formet fra vandige løsninger refereres til som ”vanlige krystaller”.



Figur 3-3: Fotografier fra produksjonen av krystallisert L-asparagin.

Tungtvannkrystaller vil kunne gi nyttig informasjon ved analyse av radikaldannelsen i L-asparagin. Når L-asparagin løses i tungtvann (D₂O), vil protoner bundet til nitrogen og oksygen med stor sannsynlighet bli byttet ut med deutroner ved utfelling av krystaller. Grunnen til dette er at bindingene mellom hydrogen og disse atomene har en betydelig ionebindingskarakter over seg. Vann og tungtvann er gode løsemidler for forbindelser med ionebindinger. Som et resultat av et stort overskudd av deutroner i en tungtvannsløsning med

protonert L-asparagin, vil det være mye mer sannsynlig at det er et deuteron bundet til nitrogen og oksygen under krystallisasjonsprosessen, enn et proton. I oppgaven vil protoner bundet til oksygen og nitrogen refereres til som *utbyttbare protoner*, i motsetning til protoner bundet til karbon som normalt er vanskelig utbyttbare under de forhold som er benyttet her.

Grunnen til at tungtvannkrystaller vil kunne være nyttige i analyseprosessen, er at koblingene til de utbyttbare hydrogenatomene ”forsvinner” i ENDOR-spektre fra tungtvannskrystaller. Dette skjer fordi hfvv-er er en funksjon av $g_N\beta_N$, noe som medfører at hfvv-er med deuteroner blir en faktor 6.5 ganger mindre enn hfvv-er med hydrogen:

$$\frac{hfvv_D}{hfvv_H} = \frac{g_D}{g_H} = \frac{0.857}{5.585} = \frac{1}{6.517}$$

Ved det samme magnetfeltoppsettet, vil derfor hfvv-er med utbyttbare protoner i vanlige krystaller være 6.5 ganger større enn de samme hfvv-ene i tungtvannkrystaller. I tillegg vil resonanslinjene fra deuteroner i spektre tatt fra tungtvannskrystaller plasseres i forhold til fri-deuteriumfrekvensen, som er rundt 2.28 MHz. Dette fører da til at i disse ENDOR-spektrene ”forsvinner” deuteron-resonanslinjene fra det frekvensområdet hvor en finner resonanslinjene som skyldes koblinger til protoner. Dette indikerer hvilket type atom protonet, som gir opphav til en linje i ENDOR-spekteret fra en vanlig krystall, er bundet til.

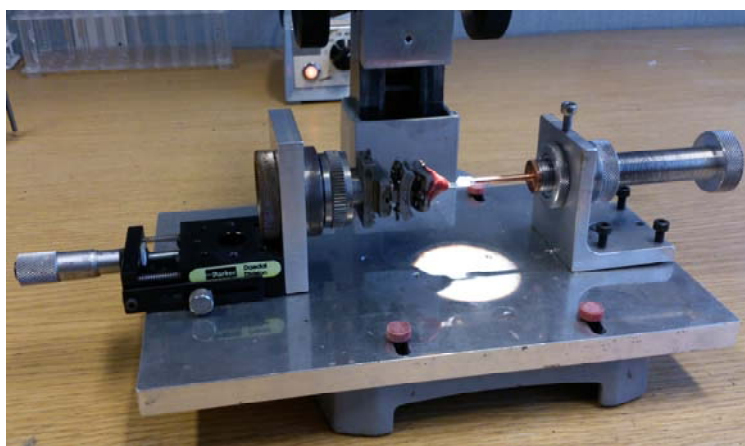
Tungtvannkrystaller ble grodd på samme måte som vanlige krystaller, men asparaginpulveret ble løst opp i tungtvann (99.9 %) fra *Larodan Fine Chemicals AB*. Det regnes med at rundt 95 % av utbyttbare protoner byttes ut ved krystallisering. For å øke utbytteprosenten ytterligere, ble første gangs utfelte tungtvannskrystaller malt opp og rekrystallisert fra D₂O før de ble benyttet i dette studiet.

3.1.2 Montering

For å samle tilstrekkelig med analysemateriale, behøvdtes krystaller orientert for rotasjon omkring alle de tre krystallaksene. <a>-aksen i asparagin var i retning av den fysiske lengste dimensjon for krystall og kalles *nålaaksen*. Denne var relativt enkel å finne, mens - og <c>-aksene var vanskeligere. Figur 1 i en artikkel om diffraksjonsstudier på L-asparagin [44] ble brukt til å finne ut hvordan de to sistnevnte var relatert i forhold til krystallenes utseende. Krystallene ble slipt til ønsket størrelse⁶ og festet til et 2-sirkelgoniometer. Deretter ble det

⁶ Maksimum 5 mm bredde for at den skal passe med det eksperimentelle oppsettet.

benyttet røntgendiffraksjon for å sikre en best mulig orientering av krystallen med hensyn på rotasjonsaksen. Etter at orienteringen var optimalisert, ble krystallen overført til en prøveholder av oksygenfritt kopper hvor den ble festet med sølv-epoxy lim, se figur 3-4. Dette limet leder strøm, noe som vil hindre at radikaler som dannes i limet under bestrålingen påvirker EMR-opptakene.



Figur 3-4: Fotografi av oppsettet da krystallen blir overført fra 2-sirkelgoniometeret til prøveholderen, og festes med sølv-epoxy lim.

Etter overføring ble krystall og prøveholder dyppet i formvar⁷ for å sikre at krystallen ikke falt av under eksperimentet, før prøveholderen med montert krystall ble skrudd fast til en kryostat som ble plassert ned i vakuum-kammeret (som også inneholder kaviteten) ved eksperimentets start.

3.1.3 Røntgendiffraksjon

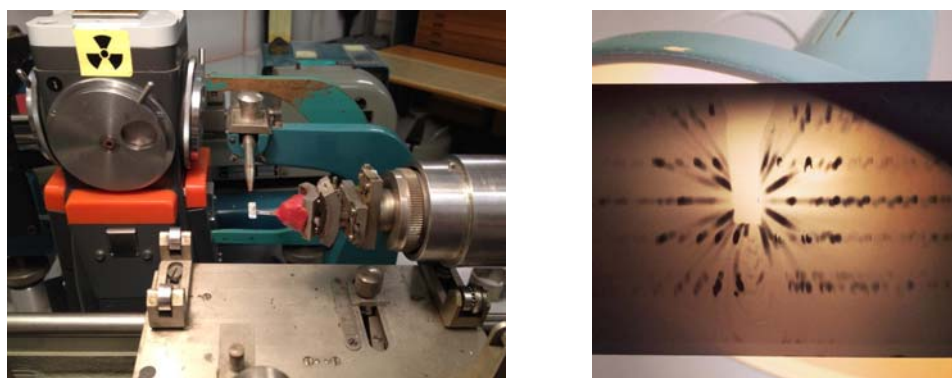
Røntgendiffraksjon er en metode som gir informasjon om kjemiske strukturer. Diffraksjon oppstår når kortbølget elektromagnetisk stråling (røntgenstråling) vekselvirker med atomære spredende punkter som er strukturert periodisk, når avstandene mellom de spredende atomene er av samme størrelsesorden som røntgenstrålens bølgelengde. Spredningsmønsteret er karakteristisk for den gitte periodiske strukturen. Ettersom L-asparaginkrystallen periodisk bygges opp av enhetsceller, kan røntgendiffraksjon brukes til å kartlegge lengden av aksene og alle atomenes plassering i forhold til hverandre. I denne oppgaven er røntgendiffraksjon kun benyttet for å bestemme lengden av enhetscelleaksene, samt deres retninger relativt til krystallens ytre form. Repetisjonen av enhetscellene gjør at overganger mellom to

⁷ Formvar består av en tynn løsning av polyvinylformal i kloroform.

enhetsceller i alle akseretninger kan sees på som parallelle krystallografiske *plan*. Lengden av enhetscelleaksene varierer i de tre ortonormale retningene, og derfor vil avstanden mellom disse parallelle planene variere. Ved å orientere en av krystallens akser vinkelrett i forhold til røntgenstrålen, vil diffraksjonsmønsteret gjenspeile avstanden mellom disse planene, det vi si, akselengden (Laue's diffraksjonsbetingelse).

I tillegg til å bekrefte krystallakselengden, kan diffraksjon si noe om hvor nøyaktig krystallen er orientert langs ønsket akse. Under diffraksjonen oscillerte krystallen $\pm 10^\circ$. Dette førte til at diffraksjonsmønsteret la seg i linjer, se figur 3-5, definert ved at både von Laue's og Bragg's diffraksjonsbetingelser er oppfylt samtidig. Dersom aksene er nøyaktig vinkelrett på røntgenstrålen, vil disse linjene bli rette og parallelle. Avvik fra dette kan måles og justeres for med bedre enn en halv grads nøyaktighet, slik at rotasjonsaksen ved EMR-eksperimentet i utgangspunktet er parallell med ønsket krystallakse. Overføringen av krystallen til prøveholderen kan imidlertid gi større usikkerheter. Det ble derfor gjennomført røntgendiffraksjon på en ferdig montert krystall for å dobbeltsjekke orienteringen. Resultatet av dette viste at krystallretningen var opprettholdt, og usikkerheten i orienteringen av aksene beregnes i denne oppgaven til å være maksimalt én grad.

Fotoet til venstre i figur 3-5 viser røntgendiffraksjonsoppsettet brukt i dette arbeidet. Røntgendiffraksjon ble utført med et *Philips PW1130 power supply* med et *Siemens* røntgenrør og *Weissenbergkamera* fra *Nonius Delft*. Røntgenrøret hadde kopper (Cu) anode, og røntgenstrålingen var ufiltrert hvilket bl.a. innebærer at både Cu K_α (1,5418 Å) og Cu K_β (1,3861 Å) karakteristisk stråling ga diffraksjon. Dette ga en svak dobling av alle reflekser i røntgenbildet (se figur 3-5), i størst grad for høyere ordens diffraksjonsmaksima-linjer. Under diffraksjonseksperimentene ble krystallen bestrålt i 30-60 min med en strøm på 25 mA og en spenning på 40 kV.



Figur 3-5: Fotoet til venstre viser røntgendiffraksjonsoppsettet og fotoet til høyre viser diffraksjonsmønsteret fra en krystall orientert langs $\langle a \rangle$ -aksen.

3.1.4 Eksperimentelt oppsett

Et EMR-eksperiment ved lavtemperatur krever et svært komplisert eksperimentelt oppsett. Flytende helium (*AGA AS*) ble benyttet for å kjøle krystallen til den ønskede temperaturen. Krystallen holdt en temperatur på rundt 6-8 K på grunn av at koppestaven som skilte transferledningen fra krystallen hadde en lengde i underkant av 4 cm, noe som førte til en liten temperaturøkning. Bestråling av krystallen ble gjort *in situ*, i et vakuum av størrelsesorden 10^{-4} Pa. Krystallene ble bestrålt med røntgenstråling for å danne radikaler. Den ioniserende strålingen ble produsert ved *Phillips PW 1732/10* power supply, med røntgenrøret *Philips 2188* og med en kromanode. Parametere på 40 mA og 60 kV ga en doserate på 9600 Gy/time, kalibrert ved EPR/alanin dosimetri. Krystallene ble bestrålt i ca. 3 timer, noe som førte til at de mottok en dose på rundt 30 kGy.

Opptak av spektre ble gjort med X-bånd EPR spektrometeret *Bruker EleXsyS 560 Super X*, med en *Bruker ER041XG* X-bånd mikrobølgebro. Kaviteten benyttet var en lavtemperaturkavitet laget ved EPR-laboratoriet (TM₀₁₁-mode) [14, 45]. Spektre ble tatt opp ved en konstant mikrobølgefrequens, mens det ytre magnetfeltet ble variert. Mikrobølgene ble generert i en Gunn-diode og attenuert for at prøven skulle motta passende mikrobølgeeffekt. Mikrobølgefrequensen ble tilpasset slik at bølgelengden passet til kaviteten hvor krystallen satt, slik at det ble satt opp et stående-bølger-mønster i kaviteten. X-bånd mikrobølger, som ble benyttet i dette studiet, hadde en frekvens på rundt 9.770 GHz, noe som tilsvarer en bølgelengde på rundt 30 mm. Selve EPR-signalet er et resultat av at resonans fører til at noe av mikrobølgeeffekten absorberes og impedansforholdene i kaviteten endres. Dette resulterer i at noe av mikrobølgene vil reflekteres inn i en detektor. Magnetfeltet moduleres av et svakt sinusoidalt magnetfelt produsert av spoler innebygget i kavitetens vegger, noe som gir et første-derivert EPR-signal. Ved ENDOR-opptak er det spoler inne i EPR-kaviteten som produserer radiofrekvensfeltet. For å oppnå tilstrekkelig styrke på dette, ble det benyttet en 200 W Amplifier Research radiofrekvensforsterker. For ENDOR er radiofrekvensfeltet modulert, noe som resulterer i at også ENDOR-signalet er første-derivert. Tabell 3-2 viser EPR/ENDOR/EIE-parametere anvendt i denne oppgaven.

Tabell 3-2: Viser EPR/ENDOR/EIE-parametere for eksperimenter med 6 K og 77 K anvendt i dette studiet.

		6 K	77 K
EPR	Attenuering (mikrobølger)	46 dB (tilsvarer 0.005 mW)	36 dB (tilsvarer 0.05 mW)
	Modulasjonsamplitude (magnetfelt)	0.1 mT	0.1 mT
	Modulasjonsfrekvens (magnetfelt)	100 kHz	100 kHz
	Sweeptid	83.89 s	83.89 s
	Tidskonstant	81.92 ms	81.92 ms
	Sweepbredde	20 mT	20 mT
ENDOR	Attenuering (mikrobølger)	12 dB (tilsvarer 12 mW)	10 dB (tilsvarer 20 mW)
	Attenuering (radiobølger)	1 dB	1 dB
	Modulasjonsdybde (radiobølger)	125 kHz	100 kHz
	Modulasjonsfrekvens (radiobølger)	25 kHz	25 kHz
	Sweeptid	167.77 s	167.77 s
	Tidskonstant	163.84 s	163.84 ms
	Sweepbredde	10-60 MHz/ 20-65 MHz	10-48 MHz
EIE	Attenuering (mikrobølger)	12 dB (tilsvarer 12 mW)	10 dB (tilsvarer 20 mW)
	Attenuering (radiobølger)	1 dB	1 dB
	Sweeptid	167.77 s	83.89 s
	Tidskonstant	327.68 ms	163.84 ms
	Sweepbredde	20 mT	20 mT

3.1.5 Eksperimentell utførelse

Spektre av vanlige krystaller ble tatt opp ved rotasjon om alle de tre krystallaksene, mens for tungtvannskrystaller kun for rotasjon om $\langle a \rangle$. ENDOR-resonanslinjer målt i tre plan er nødvendig for å bestemme de seks forskjellige elementene i den symmetriske hf_{vv}-tensoren. Opptak med rotasjon om $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ -aksen ble utført to ganger og resultatene var gjenproduserbare. Det ble valgt å benytte data fra det planet som ga flest og tydeligst avlesningspunkter. Opptak av EPR- og ENDOR-spektre ble gjort for hver femte

rotasjonsgrad over minst et 90° rotasjonsvinkelintervall. Ut fra radiofrekvensene som dekkes av sweep-intervallet til ENDOR-spektrene (se tabell 3-2) er det spinnets vekselvirkning med protoner som studeres. Fri-proton frekvensen ligger rundt 15 MHz, og det analyseres i hovedsak protonkoblinger store nok til at betingelsen $h\nu_{fri} < \frac{|A|}{2}$ er oppfylt, altså de sterkeste hfvv-ene. Det ble gjort opptak av ENDOR-spektre både fra en EPR-linje nær sentrum (kalt lavfeltlinje), og en resonanslinje ved flanken (kalt høyfeltlinje), av hvert EPR-spekter. EIE-spektre ble tatt opp ved tydelige ENDOR-linjer i spektrene med det ytre magnetfeltet rettet langs aksene.

Etter at opptak av spektre var gjennomført, ble frekvenser avlest i visualiseringsprogrammet WinEPR (se avsnitt 3.3) og hfvv-tensorer for koblingene etablert ved hjelp av programmet MAGRES86 [46]. Hver kobling, som kan følges gjennom alle tre rotasjonsplan, har en tilhørende hfvv-tensor hvor prinsipalverdiene tilhørende egenvektorer kan sammenliknes med krystallografiske data.

Det ble i tillegg utført eksperimenter med rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen for vanlig og deuterert krystall ved en temperatur på 77 K. Disse eksperimentene ble utført med samme fremgangsmåte som ved 6 K. EPR/ENDOR/EIE-parametere benyttet for disse eksperimentene er listet i tabell 3-2.

3.1.6 Site-splitting og Schonlandtvetydighet

Ettersom elektronspinnets vekselvirkning med nærliggende kjerner er orienteringsavhengig i forhold til det ytre magnetfeltet, vil resonansfrekvensen for hver kjernes absorpsjon i ENDOR-spekteret variere med magnetfeltets orientering. Når en enhetscelle inneholder mer enn ett molekyl vil det i tillegg forekomme *site-splitting*; hver resonanslinje splittes opp i vanligvis to eller fire linjer. Krystallens romgruppe viser hvordan molekylene i enhetscellen er relatert til hverandre, både i forhold til posisjon og orientering. Når det ytre magnetfeltet er langs en vilkårlig retning vekk fra krystallaksene, vil molekylene i en enhetscelle være forskjellig orientert i forhold til magnetfeltet. Dette kalles ofte for magnetiske "sites" i enhetscellen. Den forskjellige orienteringen gjelder alle de tilsvarende molekylene i alle enhetscellene som periodisk bygger opp krystallen. Ved bestråling vil det dannes radikaler i alle disse fire ulike molekylene fordelt rundt om i alle enhetscellene, og ENDOR-linjene vil da splittes inn i "sites" ved at den samme koblingen opplever ulik hfvv ut fra hvilket av de orienteringsulike molekylene i enhetscellen radikalet er dannet på. Kjemien til radikalene er

lik, men orienteringsforskjellen gjør at resonans oppleves ved forskjellige frekvenser i ENDOR-spekteret.

Enhetscellen til L-asparagin består av fire asymmetriske enheter, $Z = 4$. Det er dermed fire mulige orienteringer radikalet kan ha. Likevel vil to og to av disse være magnetisk identiske i hvert av de rotasjonsplanene som inneholder to krystallakser. Dette skyldes at symmetrioperasjonene speiler molekylene om hvert plan av akser. Ved å rotere rundt for eksempel $\langle c \rangle$ -aksen, vil to og to projisert i $\langle ab \rangle$ -planet være identiske. Dette fører til at for L-asparagin vil hver ENDOR-linje splittes inn i to "sites". Ved rotasjon om en annen akse vil det dannes et nytt og annet sett av to og to molekyler som er magnetisk identiske. Når magnetfeltet er rettet langs en krystallakse (som er totalle rotasjons-symmetriakser), vil de to "site"-ene superposisjoneres fordi koblingene da har samme orientering i magnetfeltet⁸. Orienteringene hvor site-splittingen forsvinner indikerer dermed når magnetfeltet er parallelt med krystallaksene.

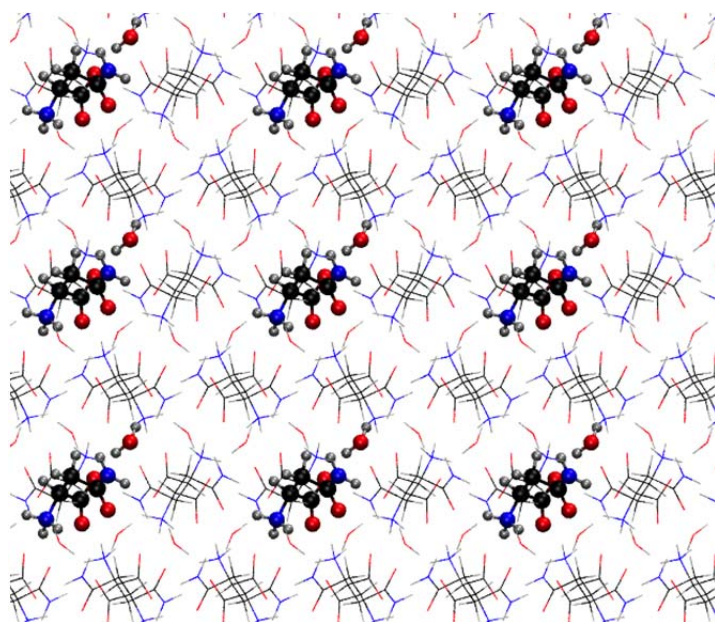
For å beregne hfvv-tensoren behøves data fra alle tre rotasjonsplan. Forbindelsen mellom hver enkel "site" i hvert enkelt plan er ikke entydig om det forekommer site-splitting i mer enn ett plan, av den grunn av at site-splittingen forsvinner langs aksene. Det er ikke mulig å vite hvilken site i det ene planet som hører sammen med hvilken site i det andre. Dette fenomenet kalles *Schonlandtvedtydighet*.

For ENDOR-linjer som splittes i to sites, slik som for L-asparagin, gir dette åtte kombinasjonsmuligheter av "sites" som kan deles inn i to sett på fire og fire tensorer. Hver av de fire løsningene innenfor hvert av settene har identiske prinsipalverdier, men forskjellige egenvektorer (svarende til hvert av de fire molekylene i enhetscellen) relatert ved krystallens symmetrioperasjoner. Det finnes altså to matematiske løsninger for hfvv-tensoren, men bare en av disse er fysisk reell. Valget mellom disse to kan være vanskelig, men i prinsippet kan det løses med et opptak ved kjent skråplan sammenliknet med opptak rundt aksene (*Atherton* [27], s. 138), eller ved å sammenlikne verdier fra ENDOR høyfrekvent- og lavfrekventlinjer fra samme kobling [47].

⁸ Orienteringen, altså retningen fra atomet hvor spinnet sitter til kjernen den vekselvirker med, er den samme men kan være i motsatt retning (180° av hverandre). Dette er uskillbart, i og med at vi ikke kjenner krystallaksenes absolutte retninger i magnetfeltet.

3.2 DFT

I denne oppgaven ble tetthetsfunksjonalteori benyttet til molekylstrukturberegninger på L-asparagin. De numeriske beregningene ble utført med periodiske grensebetingelser. Disse grensebetingelsene gir en periodisk gjentakelse av den valgte minste enhet for å best mulig gjenskape en krystall (se figur 3-6). Beregningene ble gjort på en supercelle med to enhetsceller i a-retningen. Denne supercellen inneholdt da åtte asparaginmolekyler og åtte vannmolekyler, og dermed 160 atomer. Ved å doble den korteste krystallaksen til enhetscellen, $\langle a \rangle$ -aksen, som er ca. halvparten av de andre akselengdene, økes avstanden mellom de periodiske gjentakende radikalene i supercellen og dens periodiske bilder. Under beregningene vil radikalene befinne seg i hver periodisk gjentatte enhetscelle, og ved da å utføre beregninger på en $(2a, b, c) = (11.186, 9.827, 11.808)$ [Å] celle, vil radikalene få stor nok avstand til ikke å påvirke hverandre nevneverdig [10].



Figur 3-6: Illustrasjon av periodisk gjentakelse av enhetscellene (3x3x1 celler er vist her, $\langle a \rangle$ er horisontalt, $\langle b \rangle$ er vertikalt og $\langle c \rangle$ er inn i planet) for å best mulig gjenskape en krystall. Svarte atomer viser karbon, blå atomer viser nitrogen, røde atomer viser oksygen og sølvfargede atomer viser hydrogen.

I oppgaven ble beregningsprogrammet CP2K [48] benyttet, og beregningene ble utført på beregningsclusteret *Abel* som eies av Universitetet i Oslo og norsk senter for tungregning (NOTUR). Energifunksjonalet BLYP [41, 42] ble benyttet i alle beregningene. For

beregninger på GPW [39] nivå ble GTO-basissettet TZVP-GTH [49] brukt sammen med GTH-pseudopotensialer [50-52]. For beregninger utført på GAPW [40] nivå ble GTH-basissettet TZVP-ALLELECTRON [38] anvendt for de atomsentrerte orbitalene. I tillegg ble det på begge nivåer brukt en planbølgebasis med cutoff på 400 rydberg.

Utgangspunktet for de numeriske beregningene var den intakte strukturen til L-asparagins enhetscelle. Atomkoordinatene til den ene asymmetriske enheten i enhetscellen er gitt i nøytrondiffraksjonsarbeidet til Verbist m.fl. [44], mens de andre molekylene plassering i supercellen ble beregnet ut fra symmetrirelasjonene til krystallen (se tabell 3-1). Denne uskadde og elektrisk nøytrale strukturen ble optimert med GPW, og utgjorde utgangspunktet for de øvrige DFT-beregningene.

Beregninger for hvert radikal ble gjort ved først å stabilisere strukturen på GPW-nivå. Dette ble gjort ved å legge ulike føringer på bindingslengder mellom atomer, vinkler og dihedralkvinkler. Føringerne ble lagt ved at for eksempel bindingslengder ble satt til en spesifikk verdi og holdt på plass av en fiktiv fjær med en fjærkonstant på 0.5. Føringerne ble utført for å forsøke å gjenskape radikalene funnet i den eksperimentelle analysen. For hvert radikal ble systemets ladning spesifisert ut ifra om det er et resultat av en reduksjons- (-1) eller oksidasjonsprosess (+1), og systemets spinnmultiplisitet ble satt til 2 (spinn $\frac{1}{2}$). Etter at radikalstrukturen var etablert, ble den optimert ved at alle føringer ble fjernet på GPW-nivå. Deretter ble det gjort en beregning av systemets hfvv for denne strukturen. Dersom resultatene indikerte god overenstemmelse med eksperimentelle data, ble strukturen også optimert på GAPW-nivå. Det er hfvv beregnet på den endelige optimerte strukturen som er gjengitt i oppgaven.

3.3 Analyseverktøy

- **ChemDraw Std. 7.0**

Program benyttet til å tegne 2D-figurer av kjemiske strukturer [53].

- **CP2K**

Program benyttet for molekylstrukturberegninger [48].

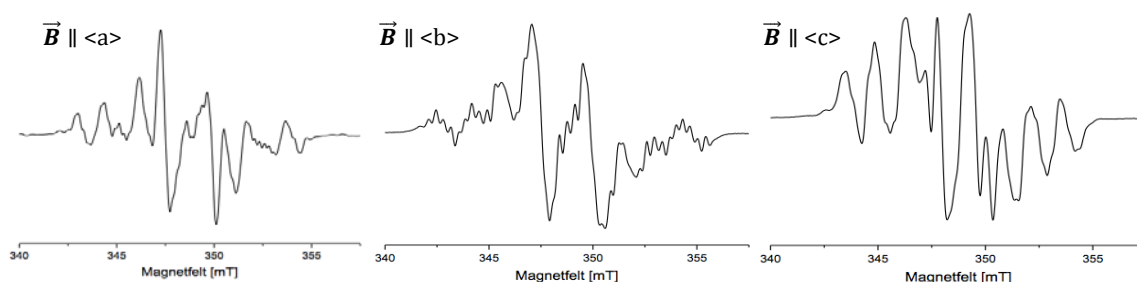
- **Elx2Wepr**
Program som brukes til å konvertere EMR-spektre til WinEPR og Ascii-format for analyse (Tomasz Wasowicz, 2004).
- **KVASAT**
Program benyttet til å simulere EPR-absorpsjonsspektre ut fra hfvv-tensorer [54].
- **MAGCALC**
Program benyttet til å beregne teoretiske ENDOR-linjer ut fra en hfvv-tensor.
Programmet er skrevet av W. H. Nelson, Georgia State University og modifisert av E. Sagstuen, Universitetet i Oslo (1987).
- **MAGRES86**
Program som tar ENDOR-frekvenser som en funksjon av orientering som input og beregner eksperimentelle hfvv-tensorer [46].
- **Origin 9.1**
Plotteprogram brukt for grafiske fremstillinger av spektre og ENDOR-linje variasjoner.
www.originlab.com
- **VMD 1.9.1**
Program benyttet til visualisering av DFT-resultatene [55].
- **WinEPR**
Program som visualiserer EMR-spektre og kan benyttes for ulike manipulasjoner.
Benyttes i denne oppgaven i hovedsak for avlesning av ENDOR-frekvenser og visuell analyse [56].
- **Xepr**
Program som brukes under opptak av EMR-spektre [57].

4 Resultater og analyse

4.1 EMR

4.1.1 EPR

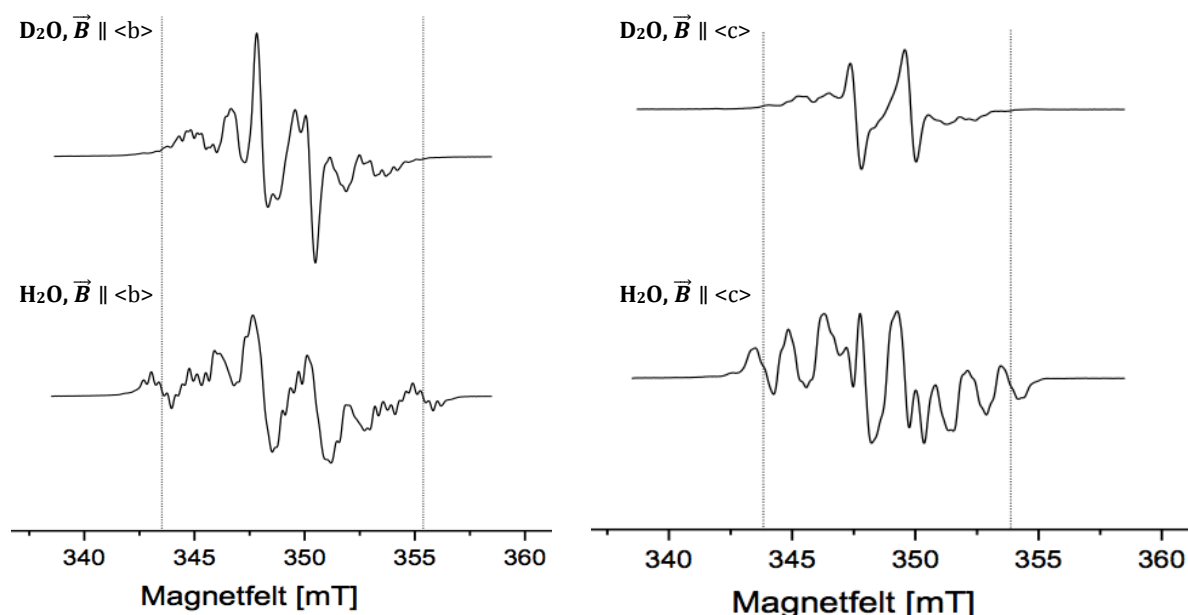
EPR-spektre av vanlige krystaller tatt opp med alle de tre krystallaksene, $\langle a \rangle$, $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ rettet parallelt med magnetfeltet er vist i figur 4-1. Plottene viser at EPR-spektre langs alle aksene består av mange delvis overlappende resonanslinjer, noe som indikerer at det er flere enn ett lavtemperaturreadikal som dannes i L-asparagin etter bestråling ved 6 K. De mest utpregete trekkene vises ved hver akse; for eksempel en stor og tydelig dublett rundt sentrum av spekteret, de mindre resonanslinjene i ytterkantene av spektrene og den store graden av symmetri. Bredden av EPR-spektrene ser ut til å være omtrent den samme ved alle orienteringene og har en verdi på omkring 12 mT, men noe bredere med $\langle b \rangle$ -aksen rettet parallelt med magnetfeltet.



Figur 4-1: Første-deriverte EPR-spektre av vanlig L-asparaginkrystall bestrålt ved 6 K tatt opp ved samme temperatur. Plottene viser EPR-spektre med magnetfeltet rettet parallelt med de tre krystallaksene. Mikrobølgefrequensene er 9.771 GHz for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$, 9.767 GHz for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 9.767 GHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$.

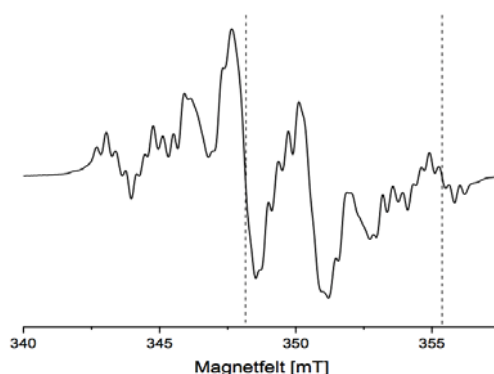
Sammenligning av EPR-spektre fra eksperimenter med deutrerete og vanlige krystaller hvor magnetfeltet er parallelt med krystallaksene $\langle b \rangle$ og $\langle c \rangle$ er vist i figur 4-2. Ved begge orienteringene observeres det at spektrene er forskjellige – de deutrerete EPR-spektrene er smalere og det ser ut til at en del hyperfinstruktur har forsvunnet, særlig med $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$. Dette tyder på at EPR-spekteret for vanlige krystaller uttrykker betydelige koblinger til protoner bundet til oksygen og/eller nitrogen, og gir dermed en hypotese om at ett eller flere av lavtemperaturreadikale i L-asparagin har ett eller flere utbyttbare protoner som vekselvirker med et uparet elektron. Det ser ut til at den store dublett-resonansen rundt sentrum av

spekteret er minst påvirket av de utbyttbare protonene, mens resonanslinjene i ytterkanten av spekteret er de som i sterkest grad påvirkes.



Figur 4-2: Sammenligning av EPR-spektre for vanlige og deuterte krystaller av L-asparagin etter bestråling ved 6 K. Plottet til venstre viser en sammenligning ved magnetfeltet parallelt med krystallaksen $\langle b \rangle$, mens for plottet til høyre er hvor magnetfeltet rettet langs krystallaksen $\langle c \rangle$. Begge de øverste plottene viser de deuterte spektrene. Spektrene er justert til mikrobølgefrequensene på 9.770 GHz for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 9.767 for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$.

Det er vanskelig å analysere radikaldannelsen i en krystall ut fra EPR-spektre alene. Den eksperimentelle EMR-analysen i denne oppgaven baserer seg derfor stort sett på opptakene av ENDOR- og EIE-spektre. I figur 4-3 illustreres hva som i denne oppgaven menes med opptak av ENDOR-spekter ved lavfeltlinje og høyfeltlinje i EPR-spekteret.



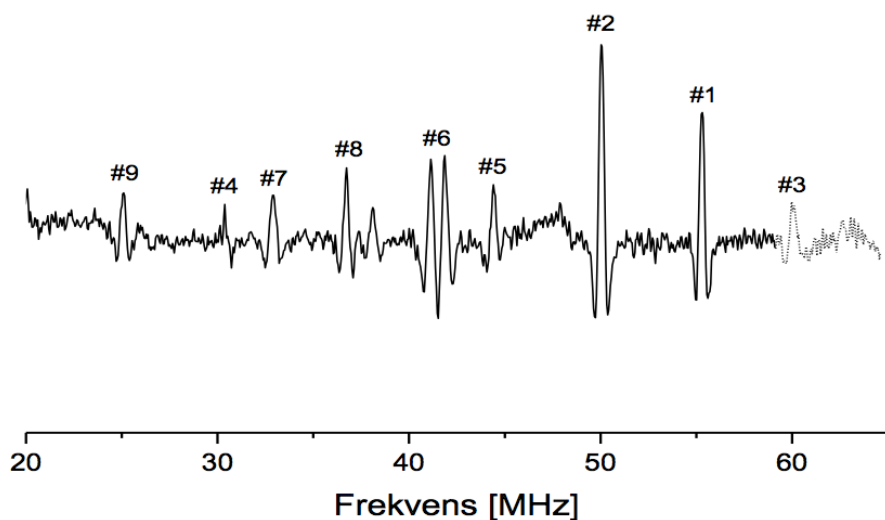
Figur 4-3: Figur som illustrerer hva som menes med lavfeltlinje (stiplet linje ved lavere magnetfelt) og høyfeltlinje (stiplet linje ved høyere magnetfelt) i et EPR-spekter. EPR-spekteret er hentet fra en vanlig krystall med $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$. Her er mikrobølgefrequensen på 9.767 GHz.

4.1.2 ENDOR og EIE

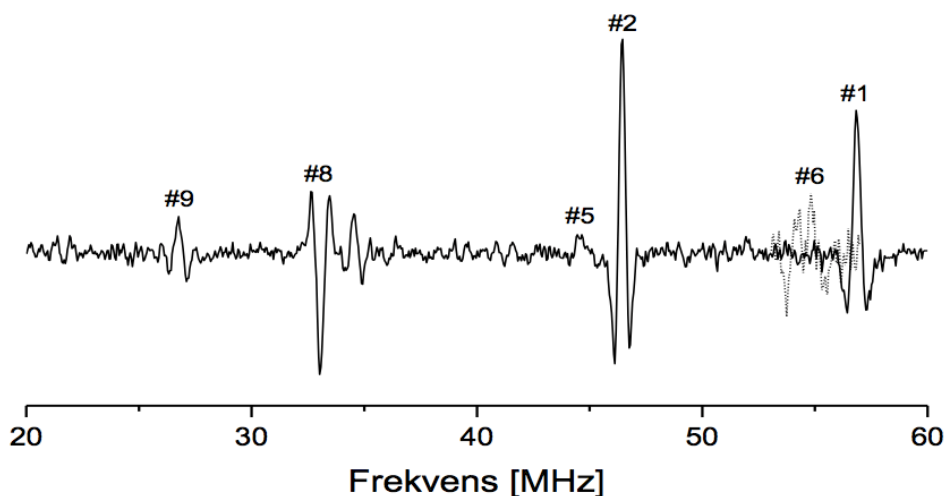
ENDOR-analysen er i hovedsak basert på protonvekselvirkninger store nok til at betingelsen $h\nu_{fri} < \frac{|A|}{2}$ er oppfylt, altså de største hfvv-ene. Noen resonanslinjer var tydelig å se ved enkelte orienteringer men vanskelig å følge gjennom flere plan, og det var en del resonanslinjer rundt fri-proton frekvensen, hvor betingelsen $h\nu_{fri} > \frac{|A|}{2}$ er oppfylt, som var vanskelig å følge på grunn av mye overlapping.

Data fra frekvensavlesninger i ENDOR-spektre fra vanlige krystaller av L-asparagin ved en temperatur på 6 K ga i alt ni hfvv-tensorer. Figur 4-4 viser ENDOR-spekteret hvor magnetfeltet er parallelt med $\langle a \rangle$ -aksen tatt ved lavfeltlinjen i EPR-spekteret. Her er de ni resonanslinjene som representerer de ni hfvv-tensorene ved denne aksens indikert med et nummer. De tilhørende hfvv-tensorene vil under analysen nummereres likt som resonanslinjene i denne figuren. De ni hfvv-tensorene representerer sju forskjellige koblinger mellom et uparet elektron og et proton. For to av koblingene var det mulig å følge både lavfrekventgrenen og høyfrekventgrenen. Dette gjelder de to høyfrekventgrenene merket #1 og #3, hvor deres tilhørende lavfrekventgrener er merket #9 og #4. At disse tilhører samme kobling indikeres både ut fra at de har svært lik anisotropi og at de skilles av en avstand på omtrent 30 MHz i ENDOR-spekteret, samt at de gir opphav til like hfvv-tensorer. For kobling #3 og #4, hvor det lyktes å gjøre opptak av EIE-spektre for begge to, vil det faktum at de begge gir opphav til samme EIE-spekter også støtte konklusjonen om at disse representerer den samme koblingen. Ettersom høyfrekventgrenen og lavfrekventgrenen til en kobling skyldes den samme hfvv-tensoren, og dermed uttrykker akkurat den samme informasjonen, er det valgt å analysere koblingene ut fra kun høyfrekventgrenene, #1 og #3.

Om ENDOR-spekteret i figur 4-4 sammenlignes med et spekter fra en tungtvannskrystall, vil det gi informasjon om hvilke av disse sju koblingene som representerer vekselvirkninger med utbyttbare hydrogenatomer. Disse koblingene vil ikke forventes å være til stede, eller vil i hvert fall være sterkt redusert i spekteret fra en tungtvannskrystall ved samme orientering. Figur 4-5 viser et ENDOR-spekter tatt ved lavfeltlinjen i EPR-spekteret og magnetfeltet rettet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen i en tungtvannskrystall. Ettersom spekteret i figur 4-5 har en annen orientering enn spekteret i figur 4-4 vil posisjonene til resonanslinjene være noe forskjellig. Her observeres det at to av koblingene, #3 (og #4) og #7, har "forsvunnet" og dermed skyldes vekselvirkninger med protoner bundet til nitrogen og oksygen. Resultatene er oppsummert i tabell 4-1.



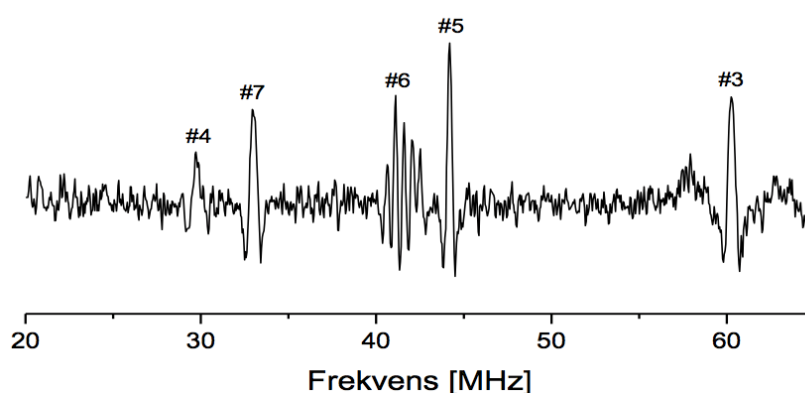
Figur 4-4: Viser et 2. derivert ENDOR-spekter for en vanlig krystall av L-asparagin tatt ved lavfeltlinjen i EPR-spekteret ved 6 K og med magnetfeltet parallelt med $\langle a \rangle$ -aksen. Resonanslinjene til de ni linjene som var mulig å følge gjennom alle planene er markert i figuren. Stiplet del til høyre i spekteret er hentet fra et annet spekter ved samme orientering, hvor det ble gjort et rf-sweep over 60 MHz. Dette ble klippet inn for å kunne vise resonanslinje #3 sin posisjon ved denne aksen. Spekteret er andrederivert. Resonanslinje #6 er splittet i to som en funksjon av liten feilorientering av krystallen.



Figur 4-5: 2. derivert ENDOR-spekter for en deuterert krystall av L-asparagin tatt ved lavfeltlinjen i EPR-spekteret og magnetfeltet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen. Spekteret viser at kun seks av de ni resonanslinjene som observeres i en vanlig krystall også observeres i en deuterert krystall. Resonanslinjene #3, #4 og #7 er ikke til stede. Stiplet del til høyre i spekteret er hentet fra et annet spekter ved samme orientering for å kunne vise resonanslinje #6 sin tilstedeværelse og posisjon ved denne aksen. Resonanslinje #8 er invertert i forhold til de andre, og dette ble observert ved alle orienteringer i dette eksperimentet. Resonanslinjen #6 er splittet som en funksjon av en liten feilorientering av krystallen.

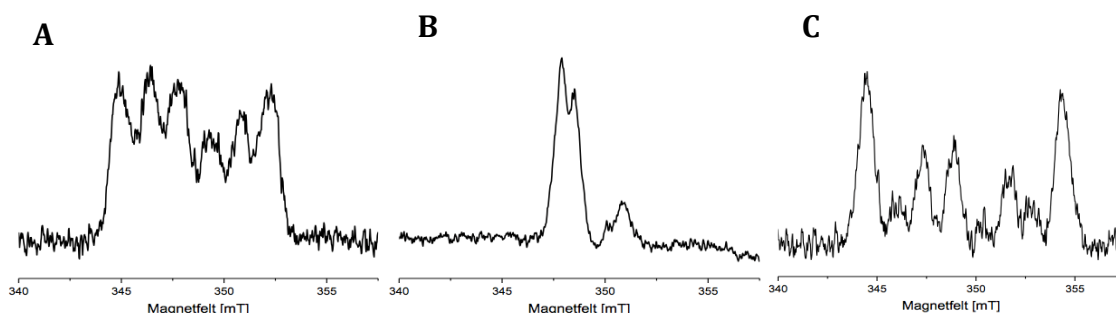
Et EPR-spekter er en sum av alle radikalenes resonansspekter. I og med at hvert radikal sitt resonansspekter senteres nær midten av EPR-spekteret, vil de aller fleste resonanslinjer vises

i et ENDOR-spekter tatt ved lavfeltlinjen. Men i et ENDOR-spekter tatt ved høyfeltlinjen, vil kun de resonanslinjene som bidrar til EPR-spektret ved denne magnetfeltstyrken avbildes, og disse vil ha det bredeste EIE-spekteret. En oversikt over hvilke koblinger som også dukker opp ved høyfelt-ENDOR er dermed til stor nytte for å kunne analysere hvilke koblinger som viser vekselvirkninger med samme spinn og dermed hører til det samme radikalet. Figur 4-6 viser ENDOR-spektret ved $\langle a \rangle$ -aksen tatt ved høyfeltlinjen i EPR-spekteret til en vanlig krystall. Figuren viser at resonanslinjene #3 (og #4), #5, #6 og #7 er tilstede ved høyfelt-ENDOR, mens resonanslinjene #1 (og #9), #2 og #8 kun er til stede ved lavfelt-ENDOR. Resultatene er oppsummert i tabell 4-1.



Figur 4-6: 2. derivert ENDOR-spekter for en vanlig krystall av L-asparagin tatt ved høyfeltlinjen i EPR-spekteret og ved magnetfeltet parallelt med $\langle a \rangle$ -aksen. Spekteret viser at kun fem av de ni resonanslinjene som observeres ved lavfelt-ENDOR også observeres ved høyfelts-ENDOR. Resonanslinjene #1, #2, #8 og #9 er ikke til stede, noe som indikerer at de har et smalere EIE-spekter.

De sju forskjellige ENDOR-resonansene gir opphav til tre ulike EIE-spektre. Dette tyder på at det er tre lavtemperaturreadikaler som kan etableres ut fra de eksperimentelle dataene. Det skilles mellom spektrene ved å se på hyperfinstrukturen, men også ved å sammenlikne bredden av spektrene. EIE-spektrene til de tre lavtemperaturreadikalene er vist i figur 4-7, og er navngitt **A**, **B** og **C**. **A**, som er tatt opp ved $\langle a \rangle$ -aksen, viser en oppsplitting i seks tydelige linjer og er det EIE-spekteret som har en medium bredde i forhold til de to andre spektrene. **B** er tatt opp ved $\langle c \rangle$ -aksen, er det smaleste og viser en stor dublett-oppsplitting som også splittes noe ytterligere. **C** er tatt opp ved $\langle c \rangle$ -aksen og er splittet opp i åtte linjer. Dette er det bredeste EIE-spekteret observert i dette lavtemperaturstudiet.

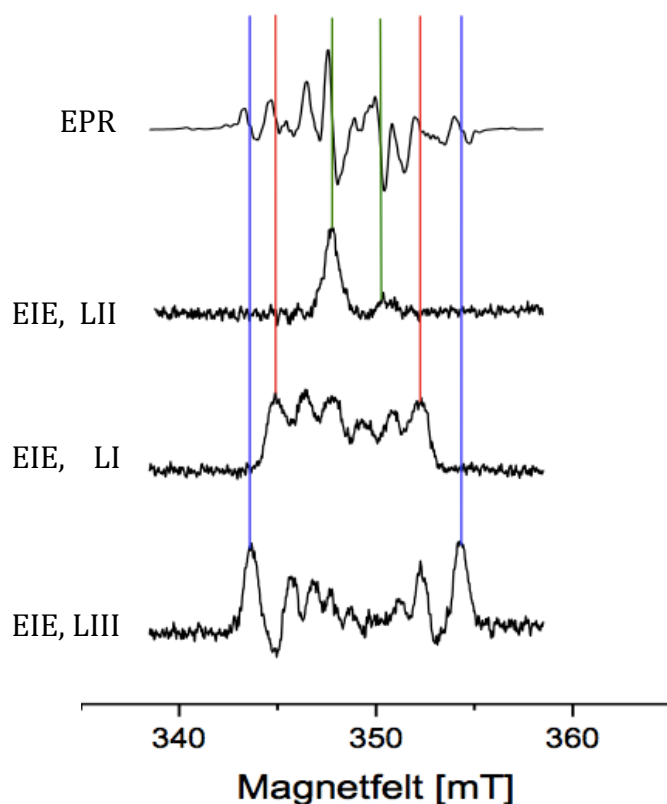


Figur 4-7: De tre EIE-spektrene observert ved dette studiet av en vanlig krystall av L-asparagin, navngitt **A**, **B** og **C**. Spektrene er tatt opp med magnetfeltet orientert langs henholdsvis $\langle a \rangle$ -, $\langle c \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksen. Observasjon av tre forskjellige EIE-spektre indikerer at tre lavtemperaturredikaler kan etableres ut fra de eksperimentelle data. Mikrobølgefrequensene er henholdsvis 9.764 GHz, 9.780 GHz og 9.781 GHz. Disse spektrene ble tatt opp med ENDOR-frekvensen låst ved 55.04 MHz for **A**, 46.38 MHz for **B** og 32.26 MHz for **C**.

De tre lavtemperaturredikalerne gis betegnelsene LI, LII og LIII, hvor "L" står for "lavtemperatur". Koblingene #1 og #8 gir begge to opphav til EIE-spekteret kalt for **A** og uttrykker derfor vekselvirkninger assosiert til radikal LI. EIE-spekteret **B** er det kun kobling #2 som gir, så denne koblingen er alene opphav til analysen av det andre radikalet kalt LII. Koblingene #3, #5, #6 og #7 viser alle EIE-spekteret **C**, så disse representerer vekselvirkninger til det samme spinnet assosiert til radikal LIII. Resultatene er oppsummert i tabell 4-1. Hvordan strukturer i EPR-spekteret langs $\langle a \rangle$ -aksen er bygd opp av en sum av de tre radikalenes respektive EIE-spekter er illustrert i figur 4-8. Her fremgår det hvordan LI og LII kun bidrar til sentrumsdelen av EPR-spekteret, mens LIII også er ansvarlig for EPR-spekterets bredde.

Grupperingene av de sju koblingene blir bekreftet ved å se på hvilke koblinger som vises i ENDOR-spektre tatt ved lavfeltlinje og høypeltlinje, se tabell 4-1. Koblingene som er et resultat av vekselvirkninger med spinnet i LIII, er de eneste som vises ved høypelt-ENDOR, noe som samsvarer med at dette radikalets EIE-spekter er bredest. At koblingene som knyttes til LI og LII har smalere EIE-spekter og forsvinner ved opptak ved høypeltlinje, bekrefter at disse koblingene ikke tilhører det samme radikalet som kobling #3, #5, #6 og #7 (LIII). Når det gjelder om koblinger vises i tungtvannsspektre eller ikke, så kan ikke dette gi noen bekreftelse på de grupperingene som er foretatt, av den grunn av at ett spinn kan vekselvirke både med utbyttbare og ikke-utbyttbare protoner. Denne informasjonen benyttes i hovedsak ved analyse av hver enkelt kobling. Radikal LIII er det eneste radikalet hvor det er observert koblinger til både utbyttbare protoner (#3 og #7) og med ikke-utbyttbare protoner (#5 og #6). Ved tidligere presentasjon av EPR-spektre, ble det påpekt at det var de ytterste

resonanslinjene som i størst grad ble påvirket i de deutrerete spektrere. Dette stemmer overens med at det er LIII som er det eneste radikalet som viser vekselvirkninger med utbyttbare protoner, også er det radikalet med bredest EIE-spekter.



Figur 4-8: Illustrasjon av hvordan EIE-spektrere til de tre lavtemperaturreadikalene bygger opp absorpsjonslinjene i EPR-spekteret. Figuren er skissert for det ytre magnetfeltet rettet parallelt med krystallens $\langle a \rangle$ -akse. Mikrobølgefrekvensen for alle spektrere er normert til 9.771 GHz.

Tabell 4-1: En oversikt over hvilke av de sju forskjellige koblingene, observert ved lavtemperaturstudier av L-asparagin, som vises i høyfelts- og lavfelts-ENDOR for vanlige krystaller tatt ved, hvilket koblinger som vises i ENDOR-spektre for deutret krystall, hvilket EIE-spekter (kalt for **A**, **B** og **C** i figur 4-7) koblingen gir og til slutt hvilke koblinger som gjennom felles EIE-spekter har vist at de representerer vekselvirkninger i radikal LI, LII og LIII.

Kobling	Lavfelt (L) / Høyfelt (H)	Vises i D ₂ O	EIE-spekter	Hører til radikal
#1	L	Ja	A	LI
#2	L	Ja	B	LII
#3	L, H	Nei	C	LIII
#5	L, H	Ja	C	LIII
#6	L, H	Ja	C	LIII
#7	L, H	Nei	C	LIII
#8	L	Ja	A	LI

4.1.3 Prosessbeskrivelse for videre analyse

I de følgende delkapitlene foretas analyser for å bestemme de kjemiske strukturene til radikalene LI, LII og LIII. Ved analysen vil, av årsaker som vil fremgå senere (kapittel 4.2.2), radikalene LI og LIII plasseres på asymmetrisk enhet nummer én i enhetscellen, mens radikal LII plasseres på asymmetrisk enhet nummer to. For hvert radikal presenteres de tilhørende koblingene en etter en, og hvilke krystallografiske retninger mellom et karbon og et hydrogen i et uskadd L-asparaginmolekyl koblingenes hfvv-tensorer i en viss grad samsvarer med. Det forventes visse avvik, bl.a. fordi det sammenlignes med retninger i et uskadd molekyl, mens molekylet ofte vil endre sin geometri ved radikaldannelse. For β -koblinger vil det være egenvektoren til maksimal prinsipalverdi (A_{\max}) som sammenlignes med krystallografiske C \cdots H retninger, mens det for α -koblinger til en viss grad er A_{\min} (den mest positive anisotrope komponenten), i tillegg til at α -koblingens intermediære retning, A_{int} , sammenlignes med retningen til den bindingen som brytes. De aktuelle krystallretningene er valgt ut fra om de i noen grad samsvarer med prinsipalverdiens egenvektor, og om koblingen viser vekselvirkning til et utbyttbart proton eller ikke. Det beregnes et avvik med hver

krystallografisk retning som gis i grader. Beregning av avviket er basert på det av fire alternativ for valgt Schonlandvariant som viser best samsvar mellom prinsipalverdiens egenvektor og den aktuelle krystallografiske retningen. De/den krystallografiske retningene/retningen som passer best med tensor-dataene, gir en indikasjon på hvilket karbon spinnnet er lokalisert til og hvilket proton spinnnet vekselvirker med. Alle krystallografiske bindingsretninger er lagt ved i appendiks A.

I tillegg til å finne radikalenes struktur, vil det, ut fra bredden av EIE-spektrene, diskuteres om koblingene observert eksperimentelt er de eneste α - og β -koblingene spinnene inngår i. Summen av et radikals hfvv-er (konvertert til mT⁹) er lik bredden av EIE-spekteret. Om EIE-spektret er betydelig bredere enn bredden de gitte koblingene utgjør, tyder det på at en eller flere koblinger av betydelig størrelse som ikke ble målt eksperimentelt bidrar til spekteret. DFT-beregninger vil kunne avsløre om hypoteser rundt dette stemmer. Tall som presenteres når det gjelder bredde av EIE-spektre baserer seg på avlesninger av absorpsjonstopper i spektrene. Dette medfører en viss usikkerhet, av den grunn at nøyaktig posisjon av et toppunkt (som avlesningen baserer seg på) ofte er vanskelig å definere. Tallene presentert er således estimer. Likevel vil disse avlesningene gi en god indikasjon på bredden, og brukes i diskusjonen.

Polarvinklene for rotasjonsaksen, θ og φ , samt nullpunktet i rotasjonsplanet, α , karakteriserer hvert rotasjonsplan¹⁰. Ettersom en optimalisering av disse tre vinklene er en del av den ikke-lineære tilpasningsalgoritmen i MAGRES86, vil θ , φ og α bli forskjellige for hver kobling på grunn av varierende datakvaliteter og avlesningsunøyaktigheter. I og med at koblingene er avlest ved samme eksperiment, skal hvert plan ha et felles sett av polarvinkler θ og φ , og α vinkler. Optimaliserte vinkler brukt for tensorene i denne oppgaven er gitt i appendiks B. Med <a>-, - og <c>-aksen menes det at disse krystallaksene er parallelt orientert med det ytre magnetfeltet.

⁹ $A [mT] = \frac{h \cdot (v^{\pm} \mp v_{fri-proton}) \cdot 2}{g_N \beta_N \cdot 10}$. Til utregninger i oppgaven ble det brukt: $v_{fri-proton} = 15 \text{ MHz}$
og $g_N \beta_N / h = 2.8 \text{ MHz/G}$. $1 \text{ mT} = 10 \text{ G}$.

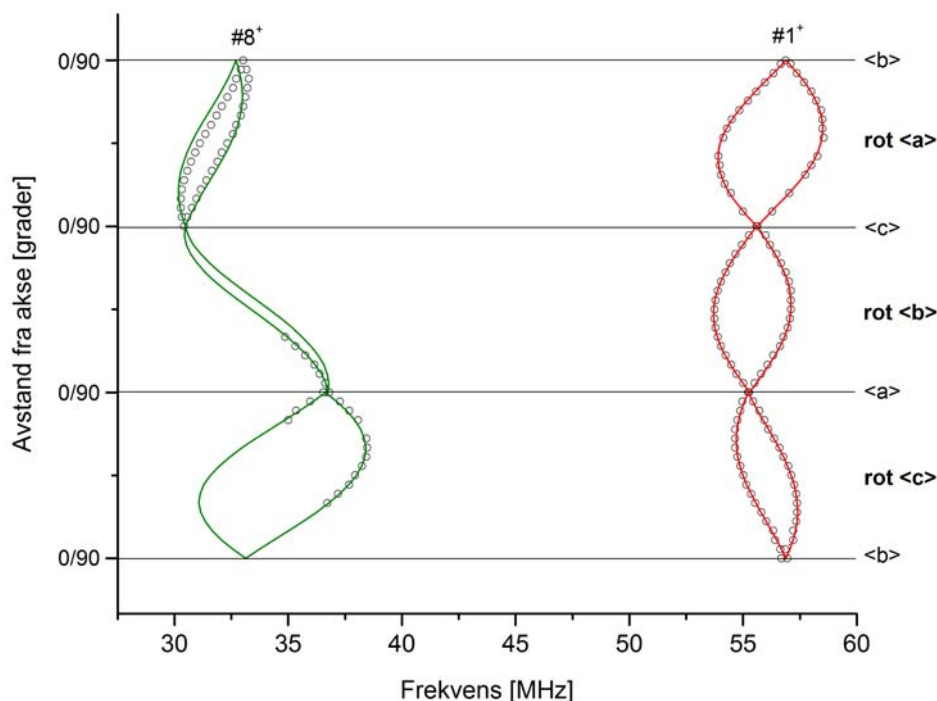
¹⁰ Rot <a>: $\theta = 90^\circ, \varphi = 0^\circ, \alpha \in [0^\circ, 180^\circ]$. Rot : $\theta = 90^\circ, \varphi = 90^\circ, \alpha \in [0^\circ, 180^\circ]$.
Rot <c>: $\theta = 0^\circ, \varphi = 0^\circ, \alpha \in [0^\circ, 180^\circ]$.

4.1.4 Radikal LI

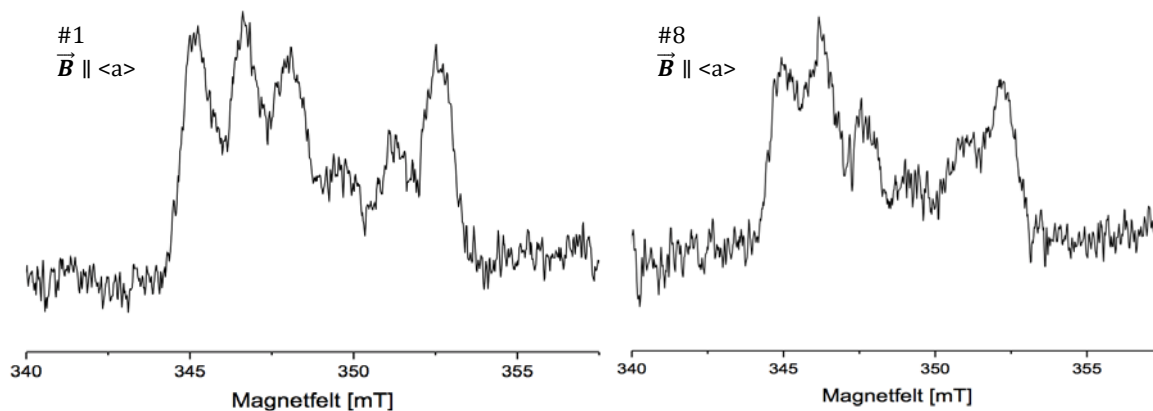
Kobling #1 og #8 viste gjennom felles EIE-spekter at de er koblinger til samme spinn, og representerer radikalet kalt LI. Figur 4-9 viser hvordan disse β -koblingene varierer med orienteringen i magnetfeltet ved rotasjon om de tre krystallaksene. Kobling #1 har en større kobling enn #8, mens #8 er mer anisotrop enn kobling #1. Begge er høyfrekventgrener. Sirklene i denne figuren er målte ENDOR-frekvenser for hver femte rotasjonsgrad. De heltrukne linjene i figuren er beregnet fra den endelige tensoren for den valgte Schonlandvariant. Plottepunktene for kobling #1 er for alle de tre rotasjonsplanene hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller. Frekvensavlesningene for denne koblingen ser ut til å stemme godt overens med den beregnende linjen ved alle orienteringer, noe som betyr at tensor #1 representerer koblingen godt. For rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen er plottepunktene for kobling #8 basert på avlesninger fra eksperimentet med deuterert krystall, mens punktene for de andre rotasjonsplanene er hentet fra vanlige krystaller. Det er få datapunkter for rotasjonene om $\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene, men de overlapper godt med den beregnende linjen. For data avlest i det deutererte spekteret finner man en del avvik fra den beregnende linjen. Dette kan være et resultat av at punktene er avlest i et eksperiment med en fri-protonfrekvens som avviker en del fra den for de to andre planene. Linjen beregnet på bakgrunn av tensoren er bestemt ut ifra en felles, gjennomsnittlig fri-proton frekvens mens selve data-analysen benytter separate fri-protonfrekvenser for hvert rotasjonsplan.

Figur 4-10 viser EIE-spekteret til kobling #1 og kobling #8 ved $\langle a \rangle$ -aksen for vanlige krystaller. Opptak langs $\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksen ga ikke EIE-spektre av god kvalitet. Spekteret viser en oppsplitting på seks tydelige linjer, og bredden av spekteret ble målt til å være mellom 7.1-7.5 mT (basert på fire avlesninger). Langs $\langle a \rangle$ -aksen har kobling #1 og #8 resonanslinjer ved henholdsvis 55.04 MHz og 36.42 MHz, noe som tilsvarer oppsplittinger på 2.86 mT og 1.53 mT i EIE-spekteret. Summen av disse er lik 4.39 mT, og sammenligning av dette tallet med bredden av EIE-spekteret viser at en vesentlig del av bredden ikke gjøres rede for. Det mangler en eller flere koblinger som utgjør en oppsplitting på omkring 2.70-3.10 mT. EIE-spektrenes oppsplitting i seks linjer, tyder på at det er en eller to koblinger av betydelig størrelse som ikke ble observert eksperimentelt. Om det er kun én kobling som mangler, og den alene skal fylle EIE-spekteret med omkring 2.70-3.10 mT, vil dette tilsvare at dens høyfrekventgren ligger i området 52-59 MHz. I dette området ser det ikke ut til at det er blitt oversett noen tydelige resonanslinjer i ENDOR-spekteret, og det er heller ikke mye

overlapping av resonanser. Det er likevel mulig det er resonanslinjer i dette området, men fullstendig fravær av observasjoner tyder på at det heller kan være to mindre protonvekselvirkninger som ikke er blitt gjort rede for ut fra de eksperimentelle data.

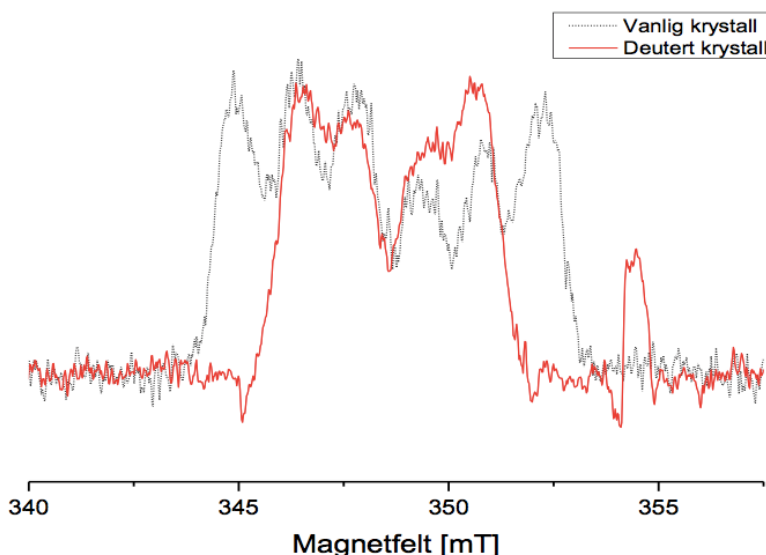


Figur 4-9: ENDOR-linjenes variasjon med rotasjonsvinkel i magnetfeltet for kobling #1 og #8 som begge knyttes til radikal LI. Sirklene representerer eksperimentelt målte verdier, mens den heltrukne linjen er beregnet ut ifra koblingens hfvv-tensor. Alle plottepunkter er avlest ved lavfelts-ENDOR, og alle er hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller, utenom rotasjon om <a>-aksen for kobling #8 som er avlesninger fra en deutert krystall. Begge plottene representerer høyfrekventgrenen til koblingen. Både bestråling og opptak er gjort ved 6 K.



Figur 4-10: EIE-spekteret ifra ENDOR-linjer for høyfrekventgrenene til koblingene #1 og #8 tatt opp ved magnetfeltet parallelt med <a>-aksen ved en vanlig krystall. Mikrobølgefrekvensene var 9.771 GHz for kobling #1 og 9.764 GHz for kobling #8. Det er gjort opptak med ENDOR-frekvensen låst ved 55.13 MHz for #1 og 36.52 MHz for #8.

EIE-spekteret til radikal LI fra en tungtvannskrystall kan være indikerende for om koblinger som ikke måles eksperimentelt viser vekselvirkninger med utbyttbare eller ikke-utbyttbare protoner. Under eksperimentene med deutrert krystall ga kun $\langle c \rangle$ -aksen gode EIE-spektre for radikal LI. Dette deutrerte $\langle c \rangle$ -aksespekteret sammenlignet med EIE-spekteret fra en vanlig krystall ved $\langle a \rangle$ -aksen vises i figur 4.11. Selv om spektrene er tatt opp ved to forskjellige orienteringer, er det til en viss grad mulig å sammenligne dem. Dette skyldes at det forventes liten variasjon i bredde og oppsplitting, i og med at β -koblinger er lite anisotrope. Figuren viser at oppsplittingen av EIE-spekteret i seks tydelig linjer reduseres til en oppsplitting i fire linjer når noen protonkjerner byttes ut med deuteriumkjerner, og at totalbredden av EIE-spekteret avtar. Det deutrerte EIE-spekteret har en bredde på omkring 4.30 mT, mens kobling #1 og #8 (som ikke er utbyttbare) her står for en oppsplitting på 2.90 mT og 1.11 mT, som til sammen er 4.01 mT. En viss feilmargin i avlesningen av bredden gjør at det her konkluderes med at kobling #1 og #8 på det nærmeste fyller hele EIE-spekteret til radikal LI i en tungtvannskrystall, og at disse to vekselvirkningene alene sørger for EIE-spekterets oppsplitting i fire tydelige linjer. Det tyder da på at koblingene til radikal LI som ikke måles eksperimentelt mest sannsynlig er vekselvirkninger av betydelig størrelse med utbyttbare protoner.



Figur 4-11: Rød linje viser EIE-spekteret til radikal LI i en deutrert krystall tatt ved magnetfeltet parallelt med $\langle c \rangle$ -aksen. Svart, stiptet linje viser EIE-spekteret til LI i en vanlig krystall tatt ved $\langle a \rangle$ -aksen. Mikrobølgefrekvensene er 9.764 GHz for vanlig krystall og 9.758 GHz for deutrert krystall. Det er gjort opptak med ENDOR-frekvensen låst ved 55.04 MHz for vanlig krystall og 55.58 MHz for deutrert krystall, hvor begge frekvensene tilsvarer kobling #1.

Kobling #1

Kobling #1 er en stor isotrop kobling til et ikke-utbyttbart proton. Tensor #1 er beregnet på grunnlag av høyfrekventgrenen til koblingen. De to Schonlandvariantene av hfvv-tensoren er gitt i appendiks C. Den ene Schonlandvarianten ga prinsipalverdier på en form som lignet mest på en β -kobling, altså ($A_{\parallel}, A_{\perp}, A_{\perp}$), og ble derfor valgt til å representere koblingen. Prinsipalverdier og tilhørende egenvektorer er presentert i tabell 4-2. Siden dette er en β -kobling er det egenvektoren til A_{\max} som sammenliknes med krystallografiske retninger. I tabell 4-3 er det valgt ut to retninger mellom et karbon og et ikke-utbyttbart proton som samsvarer noe med retningen til A_{\max} – og dermed er mulige løsninger. Tabellen viser også avviket, gitt i grader, mellom de aktuelle retningene. Prinsipalretningens avvik fra H9...C2 retningen er beregnet på bakgrunn av den tillatte fortegnskombinasjonen (- - -) på egenvektor til A_{\max} og er på 14.8°, mens avviket fra H9...C4 retningen er beregnet ut fra fortegnskominasjonen gjengitt i tabell 4-2 og er på 9.4°. Dette kan derfor i første omgang tyde på at kobling #1 representerer en vekselvirkning mellom det karbonbundne protonet H9 og et spinn lokalisert til C4, selv om forskjellen mellom de to alternativene er liten.

Tabell 4-2: Samlet informasjon om eksperimentelt observerte tensorer for radikal LI og deres avvik med den krystallografiske retningene mellom C4 og protonet som vekselvirker. Tensor #1 er beregnet ut fra de eksperimentelle data av høyfrekventgrenen til kobling #1 og alle data er hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller for alle rotasjonsplan. Tensor #8 er beregnet ut fra de eksperimentelle data for høyfrekventgrenen til kobling #8. Beregningen av tensor #8 baserer seg på data fra rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen hentet fra eksperimentet med deutertr krystall, og data er hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller for de andre rotasjonsplanene. Tallene i parentes angir den absolutte usikkerheten i siste siffer.

Tensor	Utbyttbar	Prinsipalverdier [MHz]	Egenvektor			Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Avviksvinkel ^a [grader]
			$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$			
#1	Nei	88.69 (2)	.4168 (13)	-.6925 (22)	.5888 (29)	81.76 (1)	6.93 (2)	9.4 ¹
		79.69 (2)	.7411 (8)	.6340 (16)	.2209 (32)		-2.07 (2)	
		76.90 (2)	.5263 (7)	-.3443 (36)	-.7775 (7)		-4.86 (2)	
#8	Nei	47.00 (3)	.8564 (7)	-.5071 (25)	.0972 (53)	36.67 (2)	10.33 (4)	15.4 ²
		32.83 (3)	.4848 (10)	.7248 (36)	-.4895 (52)		-3.84 (4)	
		30.14 (3)	.1778 (23)	.4663 (72)	.8666 (39)		-6.53 (4)	

^aKrystallografiske retninger:

1. H9...C4 .4895 -.7454 .4525
2. H10...C4 .9430 -.3235 -.0777

Tabell 4-3: Krystallografiske retninger som har et visst samsvarer med retningen til A_{\max} for tensor #1. De krystallografiske retningene er hentet fra asymmetrisk enhet nummer én i den intakte enhetscellen.

Krystallografisk retning	Retningsvektor			Avvik fra A_{\max} [grader]
	$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$	
H9···C2	-.3591	-.8550	-.3743	14.8
H9···C4	.4895	-.7454	.4525	9.4

Kobling #8

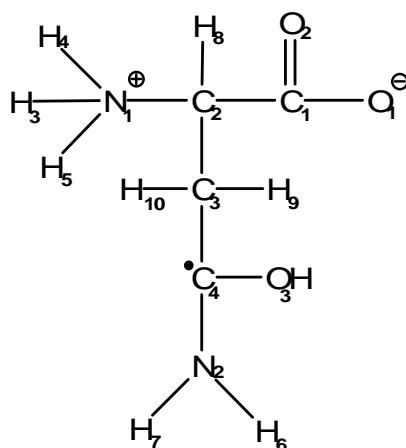
Kobling #8 er en mindre isotrop β -kobling som representerer en vekselvirkning med et ikke-utbyttbart proton. Tensor #8 er beregnet på grunnlag av høyfrekventgrenen til koblingen. Denne koblingens to Schonlandvarianter av hfvv-tensoren er uadskillbare, og begge er listet i appendiks C. Den valgte løsningen har prinsipalverdier en anelse mer på aksial β -form. Tensor #8 er presentert i tabell 4-2. Ettersom dette også er en β -kobling, er det egenvektoren for største prinsipalverdi som benyttes videre. Tabell 4-4 viser de krystallografiske retningene som i noen grad samsvarer med denne retningsvektoren og som knyttes til et ikke-utbyttbart proton, også her er det to alternativer. Avvik med begge krystallretningene er beregnet i forhold til den fortegnkombinasjonen for egenvektoren til A_{\max} som er gjengitt i tabell 4-2. Beregninger for de to aktuelle bindingsretningene viser at avviket med H8···C1 retningen på 23.7° er noe større enn avviket med H10···C4 retningen på 15.4° . Dette kan igjen tyde på at spinnet til radikal LI er lokalisert til C4, og at kobling #8 dermed representerer dets vekselvirkning med H10.

Tabell 4-4: Krystallografiske retninger som har et visst samsvarer med retningen til A_{\max} for tensor #8. De krystallografiske retningene er hentet fra asymmetrisk enhet nummer én i den intakte enhetscellen.

Krystallografisk retning	Retningsvektor			Avvik fra A_{\max} [grader]
	$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$	
H8···C1	.8599	-.4115	-.3021	23.7
H10···C4	.9430	-.3235	-.0777	15.4

Resultatene for de to koblingene til radikal LI viser at begge har godt samsvar med de krystallografiske retningene som inkluderer C4. Dette er også den eneste mulige løsningen

(ut fra krystallografiske data) om disse to koblingene skal tilhøre det samme radikalet, noe som forutsettes da de er opphav til samme EIE-spekter. Det foreslås derfor at spinnet er lokalisert til C4, og at de to koblingene som observeres eksperimentelt er koblinger til de ikke-utbyttbare protonene H9 og H10. En mulig dannelsesprosess for dette primærradikalet vil kunne være at karbonylfunksjonene i amid-gruppen (amid: $R-C(=O)-NH_2$ der R er en vilkårlig substituent) ved en reduksjonsprosess fanger inn et løsrevet elektron, noe som fører til at dobbeltbindingen mellom de sp^2 hybridiserte C4- og O3-atomene går over til å bli en enkelbinding, O3 protoneres via hydrogenbindingen til nabomolekylet og spinnet lokaliseres på C4. Radikalet er å betrakte som et *protonert amid-anion*. Figur 4-12 viser den foreslåtte kjemiske strukturen til radikal LI.



Figur 4-12: Skjematisk fremstilling av foreslått struktur for radikal LI, protonert amid-anion. Spinnet er lokalisert til C4, og de to observerte β -koblingene #1 og #8 representerer dette spinnets vekselvirkning med de ikke-utbyttbare protonene H9 og H10.

Isotropverdien til kobling #1 er $a_{H9,iso} = 81.76 \text{ MHz}$ og til kobling #8 $a_{H10,iso} = 36.67 \text{ MHz}$. I og med at begge disse to er β -koblinger, er deres isotrope verdi relatert til p-orbitalens spinn tetthet på C4 gjennom Heller-McConnell-relasjonen [32] (ligning 2.31), hvor dihedralvinkelen¹¹ er avgjørende for graden av overlapping og dermed størrelsen til isotropkoblingen. Siden både H9 og H10 er bundet til et karbon, $C_\alpha - C - H_\beta$, vil typiske verdier for konstantene i denne relasjonen være $B_0 = 0 \text{ MHz}$ og $B_2 = 126 \text{ MHz}$ [34]. Både H9 og H10 er bundet til C3. C3 er sp^3 hybridisert, noe som betyr at dets fire bindinger orienteres i rommet som en tetraheder med omtrent 109° mellom to og to bindinger. Ved å se mot C3 langs C3-C4 bindingen, vil de tre andre bindingene ut fra C4 danne omlag 120° med

¹¹ Dihedralvinkelen, θ , er vinkelen som planet utspent av $C^\alpha - X - H_\beta$ danner med retningen til p-orbitalen.

hverandre. Det er dette spinnets "ser", og dermed vil vinkelen mellom de to protonene være tilnærmet 120°. Heller-McConnell-relasjonen gir da to ligninger med to ukjente variabler:

$$a_{\beta,iso} = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho^\pi \Rightarrow$$

1. $a_{H9,iso} = 81.76 \text{ MHz} = (0 + 126 \cdot \cos^2 \theta_{H9}) \rho^\pi$
2. $a_{H10,iso} = 36.67 \text{ MHz} = (0 + 126 \cdot \cos^2 (\theta_{H9} + 120^\circ)) \rho^\pi$

Dette ligningssettet løst numerisk gir en spinnitetthet i p-orbitalen på $\rho^\pi = 0.67$ og en dihedralkvinkel for H9 på $\theta_{H9} = 11.1^\circ$. En dihedralkvinkel på 11.1° medfører stor grad av overlapping mellom spinnorbitalen og protonet, noe som resulterer i en stor isotrop vekselvirkning for kobling #1. Løsning av ligningssettet gir en dihedralkvinkel til H10 på $\theta_{H10} = 48.9^\circ$. En større vinkel resulterer i mindre overlap som igjen resulterer i en lavere isotrop vekselvirkning, noe som stemmer godt med verdiene til kobling #8. Dihedralkvinklene til H9 og H10 i et uskadd L-asparaginmolekyl er beregnet ut fra bindingsretninger i molekylet og er vist i tabell 4-5 sammen med dihedralkvinklene i radikal LI beregnet ut fra eksperimentelle data. Avviket mellom dihedralkvinklene skyldes trolig at spinnorbitalen ikke er fullstendig parallell med retningen perpendikulært på planet utspent av C3, C4 og O3, som antatt ved beregningene av dihedralkvinklene i det uskadede molekylet, men også geometriske endringer ved radikaldannelsen.

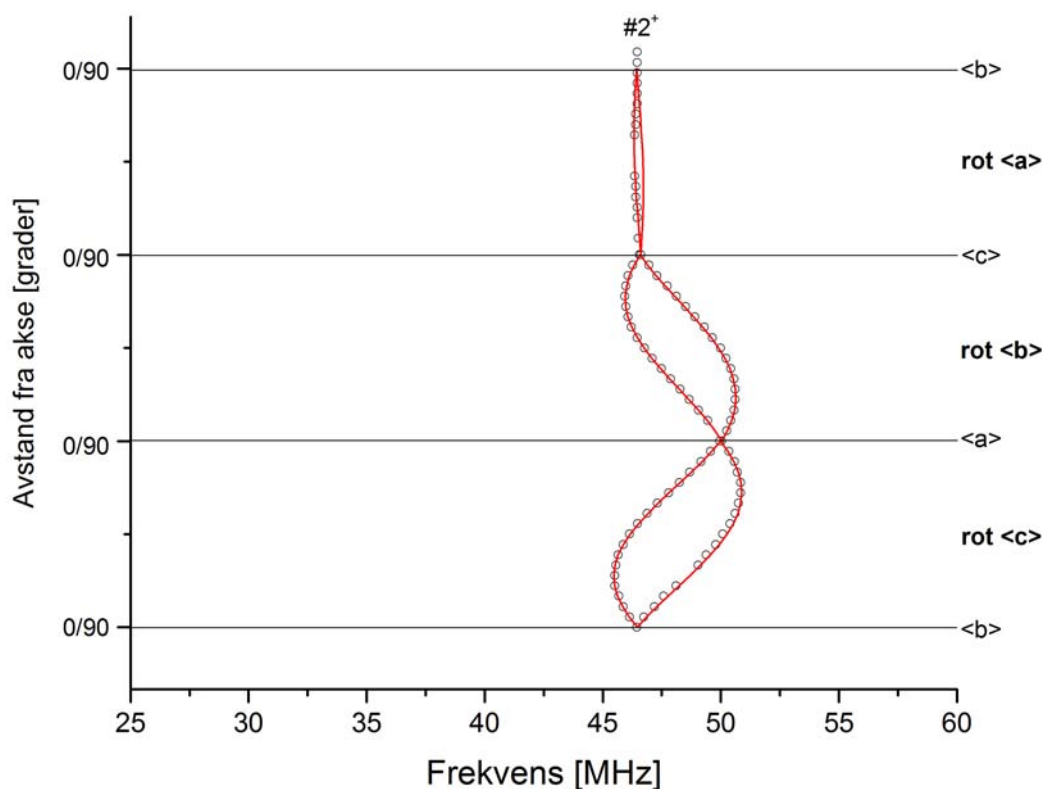
Tabell 4-5: Sammenligning av dihedralkvinklene til de to β -protonene H9 og H10 i radikal LI og et uskadd L-asparaginmolekyl. Dihedralkvinklene i radikalet er beregnet på bakgrunn av eksperimentelle observasjoner, mens dihedralkvinklene i det uskadede molekylet er beregnet ut fra bindingsretninger.

	θ_{H9} [grader]	θ_{H10} [grader]
Radikal LI	11.1°	48.9°
Uskadd molekyl	28.7°	36.8°

Som nevnt tidligere manglet det noen koblinger for å fylle ut bredden i EIE-spekteret til radikal LI ved vanlige krystaller. Dette er noe som numeriske molekylstrukturberegninger kan gi svar på, men når radikalstrukturen er kjent kan det spekuleres i hvilke koblinger, til utbyttable protoner, det kan være. Med spinnets lokalisert til C4 kan koblinger store nok til utgjøre en betydelig del av EIE-spekterbredden være β -koblinger til protonene bundet til N2, altså H6 og H7, men også det overførte protonet er en aktuell kandidat om det blir værende på O3.

4.1.5 Radikal LII

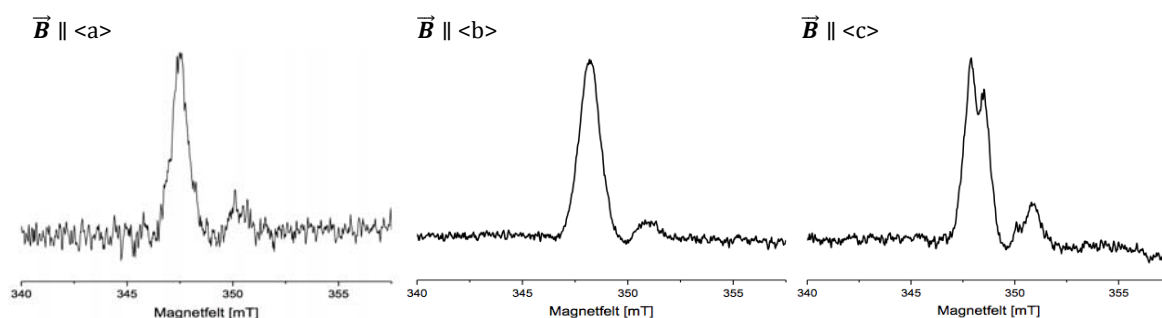
Kobling #2 er alene opphav til det EIE-spekteret som representerer radikalet kalt LII. Figur 4-13 viser hvordan β -koblingen varierer med orienteringen i magnetfeltet, og plottet viser høyfrekventgrenen til koblingen. Sirklene viser målte ENDOR-frekvenser for hver femte rotasjonsgrad, og det er disse målingene tensor #2 er beregnet ut fra. Den heltrukne linjen er beregnet ut fra den endelige tensoren for den valgte Schonlandvariant. Frekvensavlesningene for alle rotasjonsplan er hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller. Kobling #2 har en middels isotrop vekselvirkning, og en del anisotropi ved rotasjon om $\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene. De eksperimentelt avleste verdiene og de teoretiske verdiene basert på beregning med tensoren har god overenstemmelse, noe som viser at tensor #2 representerer vekselvirkningen godt. Kobling #2 vises kun ved lavfelt-ENDOR, og den er ikke forbundet med utbyttbare protoner – koblingen viser altså en vekselvirkning med et proton budet til et karbonatom.



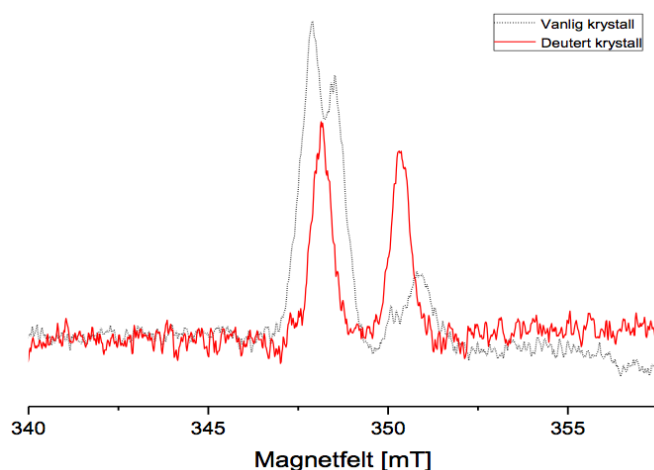
Figur 4-13: ENDOR-linjenes variasjon med rotasjonsvinkel i magnetfeltet for kobling #2 som knyttes til radikal LII. Sirklene representerer eksperimentelt målte verdier, mens den heltrukne linjen er beregnet fra koblingens hfvv-tensor. Alle datapunkter er avlest ved lavfelts-ENDOR, og alle er hentet fra krystaller. Plottet representerer høyfrekventgrenen til koblingen. Både bestråling og opptak er gjort ved 6 K.

EIE-spektre for radikal LII med de tre krystallaksene orientert parallelt med magnetfeltet er vist i figur 4-14, og viser alle en stor og tydelig dublettoppsplitting forårsaket av kobling #2. EIE-spekteret ved de forskjellige orienteringene varierer lite, noe som henger sammen med at kobling #2 er en β -kobling og dermed er relativt lite anisotrop. Frekvensene til kobling #2 i ENDOR-spektrene ved $\langle a \rangle$ -, $\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene er målt til henholdsvis 49.80 MHz, 49.29 MHz og 46.30 MHz, noe som tilsvarer hyperfinoppsplittings på omtrent 2.49 mT, 2.24 mT og 2.25 mT. Bredden av EIE-spektrene langs $\langle a \rangle$ -, $\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene er målt til ca. 3.00 mT, 2.80 mT og 3.10 mT. Det ser dermed ut til at det langs alle aksene mangler en eller flere små koblinger som skal fylle ut en liten del av totalbredden i EIE-spektrene, slik at kobling #2 ikke representerer radikal LII alene. I EIE-spekteret langs $\langle c \rangle$ -aksen observeres det at den store dubletten splittes ytterligere opp i en liten dublett. Det tyder på at det er én ekstra kobling som mangler. Denne koblingen synes å forårsake en oppsplitting på omkring 0.5-0.8 mT og havner dermed i kategorien av koblinger som vil sentreres rundt fri-proton frekvensen og som ikke er undersøkt nærmere i denne oppgaven.

Figur 4-15 viser EIE-spekteret for radikal LII hvor magnetfeltet er rettet parallelt med $\langle c \rangle$ -aksen for en tungtvannskrystall plottet sammen med spekteret fra en vanlig krystall ved samme orientering. EIE-spekterbredden i spekteret fra tungtvannskrystallen er på ca. 2.25 mT, som er noe smalere enn ved samme orientering for en vanlig krystall. I tillegg er den ekstra oppsplittingen forsvunnet i EIE-spekteret ved tungtvann. Bidraget til EIE-spekterbredden fra kobling #2 ved $\langle c \rangle$ -aksen er omtrentlig den samme i en tungtvannskrystall som i en vanlig krystall; en høyfrekventgren på 46.39 MHz tilsvarer en oppsplitting på 2.24 mT i EIE-spekteret. Kobling #2 vil ved et tungtvannspekter altså fylle opp hele EIE-spekterbredden, noe som leder til at den lille ekstra oppsplittingen som vises i vanlige krystaller må antas å være forårsaket av vekselvirkning med et utbyttbart proton.



Figur 4-14: EIE-spektre for radikal LII ved orienteringene hvor $\langle a \rangle$ -, $\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene til en vanlig L-asparaginkrystall er parallelt med magnetfeltet. Mikrobølgefrequensene var 9.764 GHz for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$, 9.779 GHz for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 9.781 GHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$. Det er gjort opptak med ENDOR-frekvensen låst ved 49.80 MHz for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$, 46.29 MHz for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 46.38 MHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$, hvor alle frekvensene tilsvarer kobling #2.



Figur 4-15: Rød linje viser EIE-spekteret til radikal LII fra en deutert krystall tatt ved magnetfeltet parallelt med $\langle c \rangle$ -aksen. Svart, stiplet linje viser EIE-spekteret til LI fra en vanlig krystall tatt ved samme orientering. Den lille ekstra oppsplittingen av den store dubletten forsvinner og EIE-spekterbredden blir noe smalere ved utbytting av enkelte protoner med deuteroner. Mikrobølgefrequensene er normalisert til 9.781 GHz. Det er gjort EIE-opptak med ENDOR-frekvensen låst ved 46.38 MHz for vanlig krystall og 46.39 MHz for deutert krystall, hvor begge frekvensene tilsvarer kobling #2.

Kobling #2

De to Schonlandvariantene av tensor #2 er gitt i appendiks C, og er uadskillbare. Igjen velges den som er en litt mer aksial β -tensor til å representere koblingen. Den valgte varianten er gjengitt i tabell 4-6. De krystallografiske retningene som samsvarer i noen grad med egenvektoren til A_{\max} er vist i tabell 4-7. Disse er begge retninger mellom et karbonatom og et ikke-utbyttbart proton i asymmetrisk enhet nummer to i enhetscellen til L-asparagin. Beregninger av avvikene for begge de to krystallografiske retningene er basert fortegnskombinasjonen vist i tabell 4-6. Utrekningene viser at avviket som retningen til

maksimal prinsipalverdi har med den krystallografiske retningen H8···C1 er på kun 2.9°, mens avviket med retningen H10···C4 er på 13.8°.

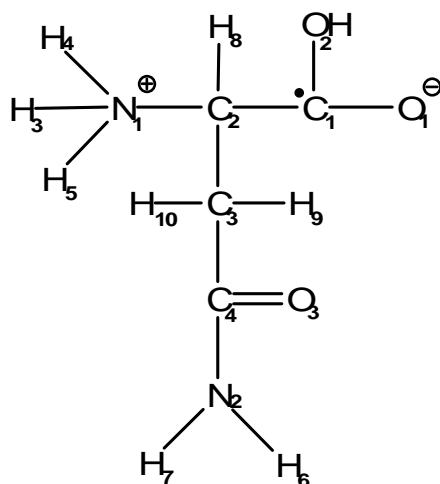
Tabell 4-6: Tensor #2 beregnet ut fra eksperimentelle data for høyfrekventgrenen til kobling #2. Alle data som beregning av tensoren er basert på er hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller. Tallene i parentes angir den absolutte usikkerheten i siste siffer.

Tensor	Utbytt -bar	Prinsipal- verdier [MHz]	Egenvektor			Isotrop- verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]
			<a>		<c>		
#2	Nei	72.66 (2)	-.8798 (4)	.3642 (38)	-.3056 (9)	65.29 (1)	7.37 (2)
		62.76 (2)	.0504 (13)	-.5671 (55)	-.8217 (40)		-2.53 (2)
		60.44 (2)	.4728 (10)	.7383 (33)	-.4810 (58)		-4.85 (2)

Tabell 4-7: Tabell med krystallografiske retninger som samsvarer noe med retningen til A_{\max} for tensor #2. De krystallografiske retningene er hentet fra kompleks nummer to i den intakte enhetscellen.

Krystallografisk retning	Retningsvektor			Avvik fra A_{\max} [grader]
	<a>		<c>	
H8···C1	-.8599	.4115	-.3021	2.9
H10···C4	-.9430	.3235	-.0777	13.8

De beregnende avvikene for kobling #2 viser at retningen mellom C1 og H8 passer best med tensor #2, men at retningen mellom H10 og C4 heller ikke har et stort avvik. Retning H10···C4 er imidlertid også en aktuell retning for kobling #8 for radikal LI, og det er vist kapittel 4.1.4 at et spinn på C4 vil ha et bredere og annerledes EIE-spekter enn det kobling #2 gir, på grunn av vekselvirkninger med flere protoner. At retning H8···C1 i tillegg gir et avvik på kun 2.9°, gjør at det konkluderes med at spinnet er lokalisert til C1 i karboksylgruppen til L-asparagin, og at kobling #2 som observeres eksperimentelt viser spinnets vekselvirkning med det ikke-utbyttbare protonet H8. En mulig dannelsesmekanisme for radikal LII er at karboksylgruppen i et uskadd L-asparaginmolekyl fanger opp et elektron, og molekylet blir et anion-radikal. Dette vil føre til at dobbeltbindingen mellom C1 og det ene oksygenet brytes, oksygenet protoneres fra et nabomolekyl og spinnet lokaliseres på karbonet i karboksylgruppen. Radikal LII ansees således å være et *protonert karboksyl-anion*. Den foreslåtte kjemiske strukturen til radikal LII er vist i figur 4-16.

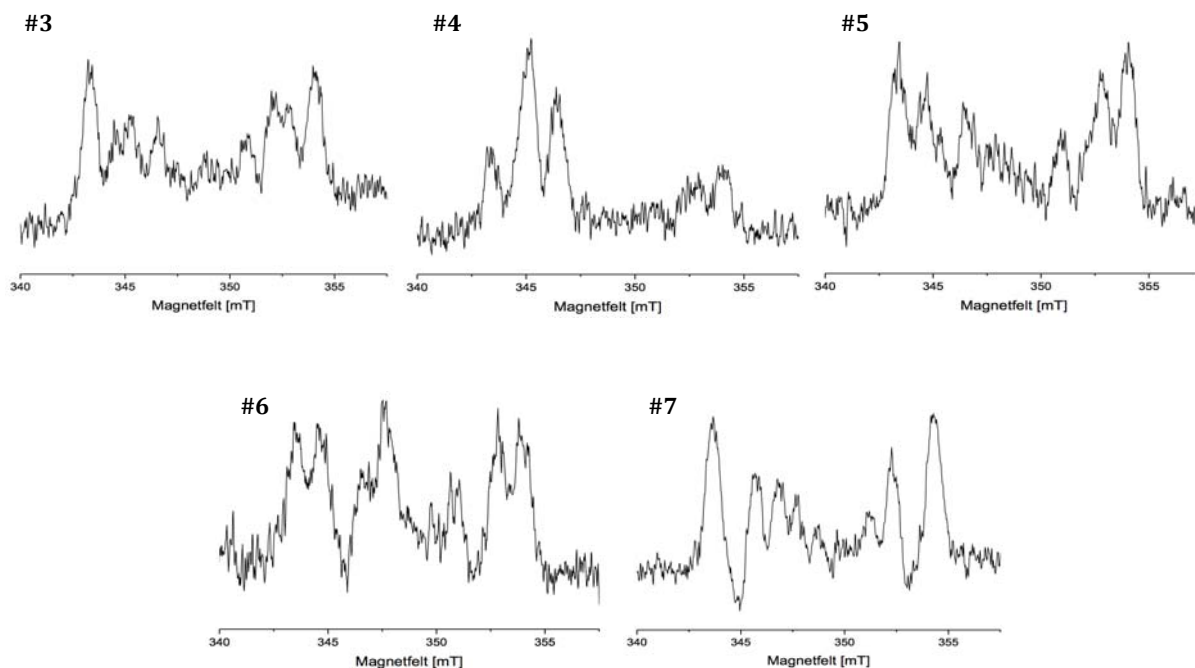


Figur 4-16: Skjematisk fremstilling av foreslått struktur for radikal LII, protonert karboksyl-anion. Spinnet er lokalisert til C1, og den observerte β -koblingen #2 representerer dette spinnets vekselvirkning med det ikke-utbyttbare protonet H8.

EIE-spekteret for vanlige krystaller ved $\langle c \rangle$ -aksen viser, som nevnt tidligere, en liten oppsplitting av den store dubletten, og det ble konkludert med at koblingen som forårsaker dette er en vekselvirkning til et utbyttbart proton. Når det nå finnes rimelig at spinnet er lokalisert til C1, kan det tenkes at dette er en kobling til det overførte protonet til et oksygen i karboksylgruppen. Dette vil være det eneste β -protonet spinnet kan vekselvirke med, ved siden av H8, og kan være utbyttbart om det i utgangspunktet var bundet til oksygen eller nitrogen. Hypoteser rundt dette skal undersøkes videre ved numeriske molekylstrukturberegninger. Andre kandidater til svake utbyttbare koblinger i dette radikalet kan være ett av amino γ -protonene.

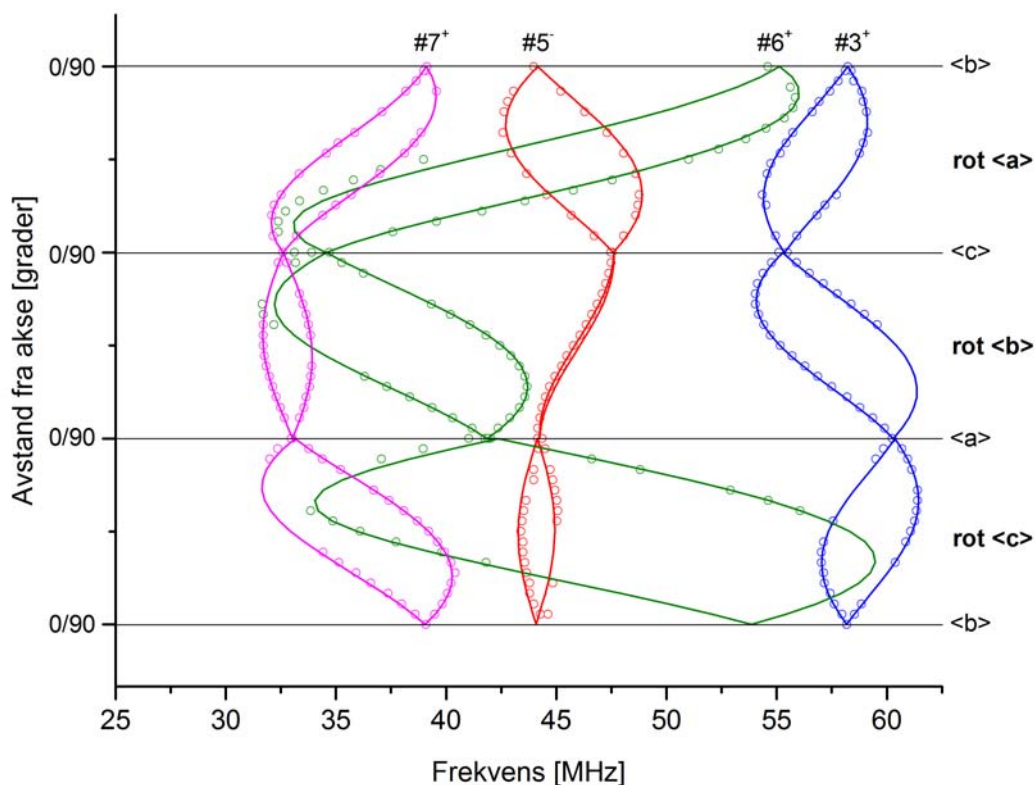
4.1.6 Radikal LIII

Kobling #3, #5 #6 og #7 viste gjennom felles EIE-spektre at de er koblinger til det samme spinnet, og de representerer radikalet kalt LIII. EIE-spektre til alle koblingene tatt med $\langle a \rangle$ -aksen i en vanlig krystall rettet parallelt med magnetfeltet, er vist i figur 4-17 (inkludert spekteret fra resonanslinje #4 som er lavfrekventgrenen til kobling #3). Figuren viser, selv om ikke alle EIE-spektrene er like tydelige, at disse koblingene gir like EIE-spektre, både når det gjelder bredden og oppsplittingen.



Figur 4-17: EIE-spektre fra de observerte ENDOR-linjene som representerer radikal LIII. Alle spektrene er tatt med krystallens $\langle a \rangle$ -akse parallelt med magnetfeltet. Mikrobølgefrekvensene er 9.764 GHz for #3, #4 og #5, 9.771 GHz for #6 og 9.779 GHz for #7. Det er gjort opptak med ENDOR-frekvensen låst ved 59.82 MHz for #3, 29.40 MHz for #4, 44.20 MHz for #5, 40.96 MHz for #6 og 32.68 MHz for #7.

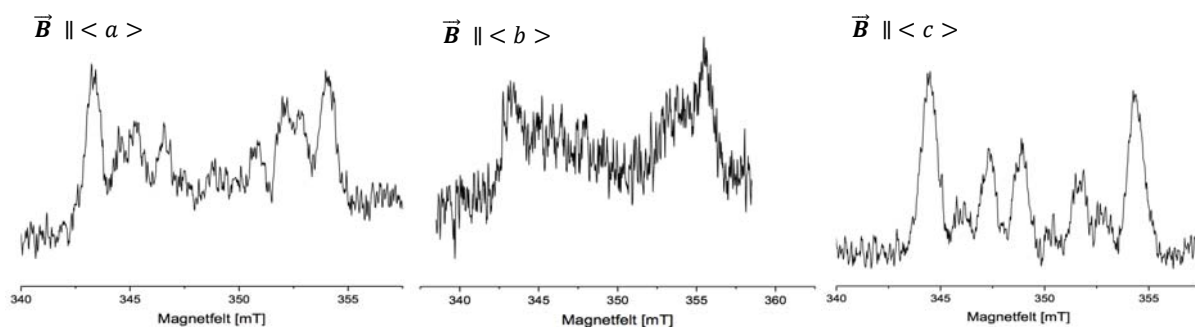
Figur 4-18 viser de fire forskjellige koblingenes variasjon med orienteringen av magnetfeltet gjennom alle tre rotasjonsplan. Kobling #3, #5 og #7 er β -koblinger og kobling #6 er en α -kobling. Dette kan sees ut i fra anisotropiene til koblingene, og bekreftes av formen til de tilhørende hf_{vv}-tensorene. Sirklene i plottet viser de eksperimentelt avleste frekvensene, mens de heltrukne linjene er beregnede verdier basert på den valgte Schonlandvariant av tensoren. Alle datapunkter er hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller, utenom punktene for rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen for kobling #6 som er hentet fra eksperimentet med en deuterert krystall. Figuren viser at det stort sett er god overenstemmelse mellom de eksperimentelle verdiene og koblingenes hf_{vv}-tensorer. Avvik ved enkelte steder kan forekomme av den grunn av at den heltrukne linjen er basert på utregninger med et gjennomsnitt av fri-protonfrekvenser for alle rotasjonsplan, og det er spesielt avvik på kobling #6 sin side til venstre. Alle disse koblingene er til stede i et ENDOR-spekter tatt ved høyfeltlinjen i et EPR-spekter. Radikalets EIE-spekter er bredest av de tre observerte EIE-spektrene. α -koblingens har stor anisotropi, og $\langle b \rangle$ -aksen er den aksens hvor den gir størst hf_{vv}. Dette kan være noe av årsaken til at EPR-spekteret var noe bredere ved denne orienteringen (se figur 4-1, kapittel 4.1.1).



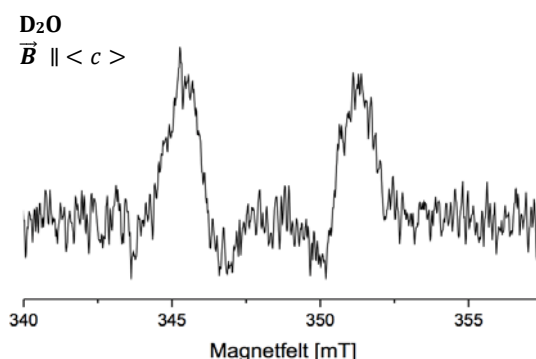
Figur 4-18: ENDOR-linjenes variasjon med orienteringen i magnetfeltet for koblingene #3, #5, #6 og #7 som knyttes til radikal LIII. Plottet viser lavfrekventgrenen til kobling #5, og høyfrekventgrenen til de andre koblingene. Sirklene representerer eksperimentelt målte verdier, mens de heltrukne linjene er beregnet ifra koblingenes hfvv-tensorer. Rotasjon om <a>-aksen for kobling #6 er hentet fra en deutreret krystall, mens alle andre datapunkter er basert på avlesninger fra spektre tatt opp ved eksperimenter med vanlige krystaller. Både bestråling og opptak er gjort ved 6 K.

EIE-spektre for radikal LIII langs alle aksene er vist i figur 4-19. EIE-spektrene langs -aksen ble ikke av god kvalitet. Det kan se ut til at spekteret langs <a>-aksen er splittet opp i elleve linjer, men det langs <c>-aksen er splittet opp i åtte. Bredden av EIE-spekteret varierer også noe med orienteringen. Langs <a>-aksen er bredden ca. 10.60 mT, langs -aksen ca. 12.10 mT og langs <c>-aksen omtrent 10.00 mT. Det er naturligvis den store anisotropien til α -koblingen som i størst grad bidrar til denne variasjonen. Ved å se på koblingenes ENDOR-frekvenser langs aksene, kan deres bidrag til bredden av EIE-spekteret angis. Ved for eksempel <a>-aksen har kobling #3 en høyfrekventgren på 59.82 MHz, noe som tilsvarer 3.20 mT. Lavfrekventlinjen for kobling #5 er ved 44.20 MHz som tilsvarer 4.23 mT, mens for kobling #6 gir dens høyfrekventgren på 40.82 MHz en bredde på 1.84 mT. Kobling #7 har en høyfrekventgren ved 32.70 MHz, noe som gir en bredde på 1.26 mT. Summen av disse oppsplittingene er på 10.53 mT, noe som fyller hele bredden langs <a>-aksen. Også langs

$\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene gjør de observerte koblingene alene rede stort sett hele totalbredden til EIE-spektrene. Ut fra dette konkluderes det med at det ikke er noen ekstra koblinger til dette spinnnet som er store nok til å bli observert eksperimentelt. Figur 4-20 viser det beste deutrerete EIE-spekteret til LIII detektert i dette studiet, tatt opp med magnetfeltet parallelt med $\langle c \rangle$ -aksen. Oppsplittingen i figuren er ikke tydelig, men det kan se ut til at det er en liten antydning til fire topper. Det er likevel mulig å lese av bredden, som ligger på omkring 5.90 mT. Det er kun kobling #5 og #6 som gir opphav til denne bredden, ettersom de to andre koblingene er vekselvirkninger med utbyttbare protoner. Oppsplittingene fra kobling #5 og #6 langs denne aksen i tungtvannskrystallen er på henholdsvis 4.48 mT og 1.34 mT. Summen av disse er lik 5.82 mT, og fyller dermed hele bredden av EIE-spekteret. Det er dermed klart at største del av EIE-spekterbredden utgjøres av #3, #5, #6 og #7 alene.



Figur 4-19: EIE-spekteret til radikal LIII med magnetfeltet rettet langs alle de tre aksene. Mikrobølgefrekvensene var 9.770 GHz for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$, 9.779 GHz for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 9.780 GHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$. Det er gjort opptak med ENDOR-frekvensen låst ved 59.82 MHz (kobling #3) for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$, 58.0 MHz (kobling #3) for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 32.26 MHz (kobling #7) for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$.



Figur 4-20: Det beste EIE-spekteret for radikal LIII tatt opp under eksperimentet med deutreret krystall. Krystallens $\langle c \rangle$ -akse er rettet parallelt med magnetfeltet. Mikrobølgefrekvensen var 9.752 GHz. EIE-spekteret er tatt opp ved en ENDOR-frekvens på 33.40 MHz (kobling #6).

Kobling #3

Kobling #3 er en stor isotrop β -kobling som representerer en vekselvirkning med et utbyttbart proton. Tensor #3 er beregnet ut fra høyfrekventgrenen til koblingen. Den valgte Schonlandvarianten er gitt i tabell 4-8, og er den løsning som er på formen til en β -kobling. Den andre varianten er vist i appendiks C. Tabell 4-9 viser at det kun er en krystallografisk retning, H5...C2, som har noe rimelig samsvar med egenvektoren til denne koblingens største prinspalverdi, og som involverer et utbyttbart proton. Avviket mellom dem beregnet ut fra den fortegnskombinasjonen listet i tabell 4-8, og er på kun 4.4°.

Tabell 4-8: Tensor #3 er beregnet ut fra eksperimentelle data for høyfrekventgrenen til kobling #3. Tensor #5 beregnet ut fra eksperimentelle data for lavfrekventgrenen til kobling #5. Alle data som beregningene av tensorene er basert på er hentet fra eksperimenter med vanlige krystaller. Tallene i parentes angir den absolutte usikkerheten i siste siffer.

Tensor	Utbyttbar	Prinspal-verdier [MHz]	Egenvektor			Isotrop-verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]
			<a>		<c>		
#3	Ja	95.00 (2)	.7855 (7)	.4775 (15)	-.3936 (16)	85.31 (1)	9.69 (2)
		83.69 (2)	.5385 (13)	-.8408 (10)	.0548 (15)		-1.62 (2)
		77.25 (2)	.3048 (7)	.2551 (17)	.9176 (3)		-8.06 (2)
#5	Nei	128.05 (2)	.0950 (13)	-.4786 (15)	-.8729 (36)	120.73 (1)	7.32 (2)
		119.11 (2)	.9265 (9)	-.2783 (30)	.2533 (11)		-1.62 (2)
		115.04 (2)	.3641 (6)	.8328 (24)	-.4170 (12)		-5.69 (2)

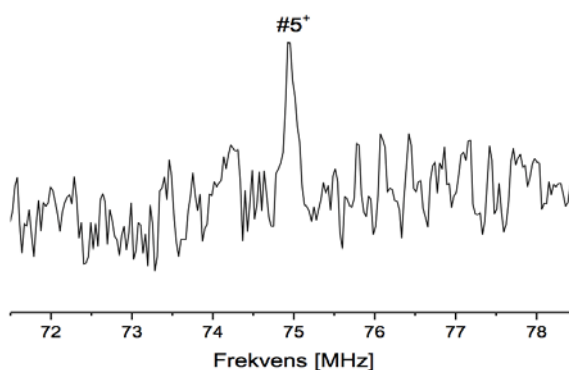
Tabell 4-9: Krystallografisk retning som til en viss grad samsvarer med retningen til A_{\max} for tensor #3. Den krystallografiske retningen er hentet fra asymmetrisk enhet nummer én i den intakte enhetscellen.

Krystallografisk retning	Retningsvektor			Avvik fra A_{\max} [grader]
	<a>		<c>	
H5...C2	.7369	.5139	-.4391	4.4

Kobling #5

Dette er den største isotrope β -koblingen observert i dette studiet og representerer en vekselvirkning til et ikke-utbyttbart proton. ENDOR-linjene som illustrerer kobling #5 i figur 4-18 ligger forholdsvis høyt i spekteret. Ved start av analysene ble det derfor antatt at dette var høyfrekventgrenen til koblingen, og det ble gjort tensor-beregninger basert på dette. Det ble senere oppdaget at noen innstillinger under opptak av EIE-spekter for kobling #5

samsvarte med at frekvensene representerte koblingens lavfrekventgren. Det ble da satt i gang et nytt forsøk¹² mot slutten av masteroppgaveforløpet med en hypotese om å finne høyfrekventgrenen til kobling #5. Lavfrekventgrenen ligger omkring 45 MHz, så den forventede høyfrekventgrenen skulle ligge omkring 75 MHz. Hypotesen for dette ekstra forsøket ble bekreftet, og resonanslinjen som representerer høyfrekventgrenen langs <a>-aksen er vist i figur 4-21. Det lyktes ikke å ta opp EIE-spekter ved høyfrekventgrenen til kobling #5.



Figur 4-21: Et 2. derivert ENDOR-spekter for en vanlig krystall av L-asparagin tatt ved senterlinjen i EPR-spekteret og med <a>-aksen parallelt med magnetfeltet. ENDOR-resonanslinjen markert er høyfrekventgrenen til kobling #5.

Beregningen av tensor #5 er gjort på bakgrunn av lavfrekventgrenen til koblingen. De to Schonlandvariantene er uadskillbare. Begge er gjengitt i appendiks C, men den med en anelse mer aksial β -form er også gjengitt i tabell 4-8. Kun én krystallografisk retning til et ikke-utbyttbar proton samsvarer til en viss grad med retningen til A_{\max} , se tabell 4-10. De to retningene har kun et avvik på 2.6° . Dette avviket er beregnet på bakgrunn av fortegnskombinasjonen gitt i tabell 4-8.

Tabell 4-10: Krystallografisk retning som til en viss grad samsvarer noe med retningen til A_{\max} for tensor #5. Den krystallografiske retningen er hentet fra asymmetrisk enhet nummer én i den intakte enhetscellen.

Krystallografisk retning	Retningsvektor			Avvik fra A_{\max} [grader]
	<a>		<c>	
H10...C2	.0945	-.4372	-.8944	2.6

¹² I dette forsøket ble disse parameterne i ENDOR-oppsettet byttet ut: attenuering av radiofrekvensfelt 3 dB, sweeptid 335.54 s, tidskonstant 327.68 ms og sweepbredde 70-80 MHz.

Kobling #6

Kobling #6 er den eneste α -koblingen observert i dette lavtemperaturstudiet. Dens store anisotropi gjør at resonanslinjene delvis overlapper med andre koblinger i ENDOR-spektrene. Videre er koblingen høyst sensitiv for selv en liten ($0.5 - 1^\circ$) feilorientering av krystallen. Dette resulterer i at det noen steder observeres en svak oppsplitting av resonanslinjene. Dette gjorde det vanskelig å følge denne koblingen i alle tre rotasjonsplanene. Likevel var det mulig å få nok informasjon i hvert plan til å etablere en hfvv-tensor for koblingen. Tensor #6 ble beregnet ut fra høyfrekventgrenen til koblingen, og der resonanslinjene splittes ekstra ble frekvensavlesningene basert på et gjennomsnitt. Den ene Schonlandvarianten hadde prinsipalverdier utypisk for en α -kobling. Begge variantene er gitt i appendiks C, mens den valgte Schonlandvarianten av tensor #6 også er gitt i tabell 4-11. I dette studiet ble ikke lavfrekventgrenen til denne koblingen observert, slik at det ikke var eksperimentelt mulig å skille mellom de to Schonlandvariantene med det sett av rotasjonsplan som ble benyttet i dette arbeidet.

I L-asparaginmolekylet er det kun tre protoner som er plassert en sigmabinding unna et karbon, og dermed er mulige α -protoner. Dette er H8, H9 og H10. Alle disse tre er, ved å være bundet til karbon, ikke-utbyttbare. H8 er bundet til C2 mens H9 og H10 er bundet til C3. Det er følgelig kun C2 og C3 som er kandidater for å være de karbonatomene det uparede spinnet er lokalisert til i radikal LIII. Basert på dette er det fire radikaler-alternativer som kan gi opphav til en α -kobling. Som nevnt innledningsvis vil for en α -kobling den intermediære prinsipalverdien, A_{int} , være i retning av den brutte bindingen, mens den minste prinsipalretningen, A_{min} , til en viss grad vil samsvare med retningen mellom karbonet og α -protonet. Spinnet kan lokaliseres på C2 ved at bindingen C2-C1 eller C2-N1 brytes (parallell med A_{int}), og hvor da retningen C2-H8 skal forventes å være nær parallell med A_{min} . Spinnet kan lokaliseres på C3 ved at H9-C3 eller H10-C3 brytes, og en av disse retningene vil da være parallell med A_{int} . Hvis H9-C3 brytes, vil egenvektoren til A_{min} være parallell med H10-C3, og omvendt.

I tabell 4-12 er det valgt å beregne avvik mellom egenvektorene og retninger knyttet til alle de fire alternativene, nummerert **1-4**. For hvert av de fire alternativene er først avviket med A_{int} beregnet, og deretter avviket med A_{min} . For alternativ **1** og **3** er avvikene beregnet på bakgrunn av den tensor som av fire muligheter gir fortegnskombinasjon gitt i tabell 4-11. For alternativene **2** og **4** er avvikene beregnet ut fra de tensoralternativer som gir fortegnskombinasjonene på henholdsvis (+ + -) og (+ - +) for intermediærretningen og

samhørende (+ + +) og (+ - -) for retningen av minste prinsipalverdi. Resultatene viser at et spinn lokalisert til C2 og hvor bindingen mellom C2 og C1 brytes, gir det beste resultatet. Avviket mellom A_{int} -retningen og retningen til bindingen C2-C1 er kun 5.4° , mens avviket mellom A_{min} -retningen og H8-C2 er 19.3° .

Tabell 4-11: Tensor #6 beregnet ut fra eksperimentelle data for høyfrekventgrenen til kobling #6. Tensor #7 beregnet ut fra eksperimentelle data av høyfrekventgrenen til kobling #7. Data til rotasjonsplan om $\langle a \rangle$ -aksen for kobling #6 er hentet fra eksperimentet med deutreret krystall, mens resten av data er fra eksperimenter med vanlige krystaller. Tallene i parentes angir den absolutte usikkerheten i siste siffer.

Tensor	Utbytt-bar	Prinsipal-verdier [MHz]	Egenvektor			Isotrop-verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]
			$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$		
#6	Nei	-89.08 (5)	.4888 (6)	.8664 (6)	.1019 (3)	-53.67 (3)	-35.42 (6)
		-51.97 (4)	.6484 (3)	-.2827 (7)	-.7069 (6)		1.7 (5)
		-19.95 (4)	.5837 (7)	-.4116 (5)	.6999 (5)		33.72 (5)
#7	Ja	51.03 (2)	.3835 (9)	.8913 (104)	.2420 (35)	39.16 (1)	11.87 (2)
		33.81 (2)	.3031 (4)	-.3690 (35)	.8786 (49)		-5.35 (2)
		32.64 (2)	.8724 (8)	-.2636 (50)	-.4117 (104)		-6.52 (2)

Tabell 4-12: Beregnet avvik mellom egenvektorer for tensor #6 og krystallografiske retninger av de fire alternativene til radikaltyper som gir en α -kobling i L-asparagin. For hvert alternativ beregnes først et avvik med tensorens retning for A_{int} og retningen for bindingsbrudd, og deretter avviket mellom retningen for A_{min} og den krystallografiske retningen mellom karbonet som holder spinnnet og protonet det vekselvirker med. De krystallografiske retningene er hentet fra asymmetrisk enhet nummer én i den intakte enhetscellen.

Alternativ	Krystallografisk retning	Retningsvektor			Avvik [grader]
		$\langle a \rangle$	$\langle b \rangle$	$\langle c \rangle$	
1	C2-C1	.6650	-.1906	-.7221	5.4 (A_{int})
	H8-C2	.7342	-.5296	.4249	19.3 (A_{min})
2	N1-C2	.4095	.8496	-.3324	44.5 (A_{int})
	H8-C2	.7342	-.5296	.4249	59.2 (A_{min})
3	H10-C3	.6908	-.1043	-.7155	12.0 (A_{int})
	H9-C3	-.2038	-.9256	.3190	61.0 (A_{min})
4	H9-C3	-.2038	-.9256	.3190	68.9 (A_{int})
	H10-C3	.6908	-.1043	-.7155	18.3 (A_{min})

Kobling #7

Kobling #7 er den minst isotrope β -koblingen som knyttes til radikal LIII, og representerer spinnets vekselvirkning med et utbyttbart proton. Tensor #7 er beregnet ut fra høyfrekventgrenen til koblingen. Begge Schonlandvariantene er gitt i appendiks C, og den ene som var på typisk β -form er også gitt i tabell 4-11. I tabell 4-13 er det listet tre alternativer til krystallografiske retninger som alle er knyttet til utbyttbare protoner i tillegg til at å ha en retning som samsvarer noe med egenvektoren til A_{\max} for kobling #7. Avviket med retning H3 \cdots C2 er beregnet ut fra den tensorvariant som gir fortegnskombinasjonen for egenvektoren til A_{\max} på (+ + -), mens avviket med retningen H7 \cdots C4 ut fra varianten som gir (+ - -). Avviket med H4 \cdots C2 er beregnet ut fra tensorvarianten listet i tabell 4-11. Basert på avvikene ser det ut til at koblingen best representerer en vekselvirkning mellom C2 og H4. For denne krystallografiske retningen er avviket kun 6.4° med egenvektoren til A_{\max} i kobling #7.

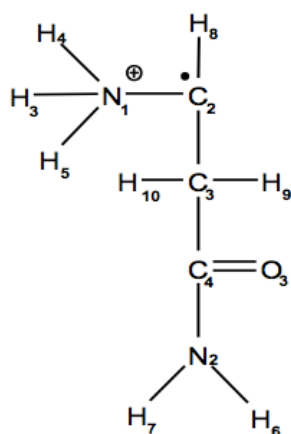
Tabell 4-13: Krystallografiske retninger som har et visst samsvar med retningen til A_{\max} for tensor #7. De krystallografiske retningene er hentet fra asymmetriske enhet nummer én i den intakte enhetscellen.

Krystallografisk retning	Retningsvektor			Avvik fra A_{\max} [grader]
	<a>		<c>	
H3 \cdots C2	.0160	.8163	-.5774	29.2
H4 \cdots C2	.3669	.9204	.1351	6.4
H7 \cdots C4	-.0258	-.7304	-.6825	36.4

En samlet vurdering av analysen gjort for hver observerte kobling som knyttes til radikal LIII, tyder i stor grad på at radikalets spinn er lokalisert til C2. Alle de fire koblingene ga best samsvar med krystallografiske retninger ut fra nettopp denne posisjonen. Kobling #3 representerer spinnets vekselvirkning med H5, kobling #5 dets vekselvirkning med H10, kobling #6 dets vekselvirkning med H8 og kobling #7 vekselvirkningen med H4. Når det gjelder α -koblingen, kobling #6, hvor spinnets kun hadde mulighet til å være plassert på to karbonatomer, så er et spinn på C2 i prinsippet den eneste mulig løsningen med tanke på antall β -koblinger spinnets også skal ha mulighet til å vekselvirke med.

Radikal LIII er foreslått å være et resultat av en oksidasjonsprosess. Bestrålingen fører til at et elektron fjernes fra L-asparagin, molekylet blir et kation og har en netto positiv ladning. Videre mekanismer fører til at karboksylgruppen spaltes av, noe som bekreftes av at

kobling #6 sin intermediære prinsipalretning kun har et avvik på 5.4° fra C2-C1 retningen som ved dekarboksylering er den brutte retningen. Radikal LIII foreslås derfor å være et *dekarboksyleringsprodukt*. Den sp^3 -hybridiserte C2 rehybridiserer til sp^2 ved dekarboksyleringen, og de tre gjenværende bindingene ut fra C2 vil ligge i nodalplanet til p-orbitalen hvor spinnet er lokalisert. Denne rehybridiseringen kan føre til en viss bukling av molekylet som da vil medføre et større avvik mellom A_{\min} retningen til kobling #6 og H8-C2 retningen i det uskadde molekylet. Skjematisk fremstilling av den kjemiske strukturen til radikal LIII er vist i figur 4-22, og samlet informasjon om tensorer og avvik fra krystallografiske retninger for radikal LIII er listet i tabell 4-14.



Figur 4-22: Skjematisk fremstilling av foreslått struktur for radikal LIII. Spinnet er lokalisert til C2, og eksperimentelt observerte vekselvirkninger er til β -protonene H4 (#7), H5 (#3) og H10 (#5) og α -protonet H8 (#6). Radikalet er betraktet å være et dekarboksyleringsprodukt.

Tabell 4-14: Samlet informasjon om eksperimentelt observerte tensorer for radikal LIII og deres avvik med den krystallografiske retningen mellom spinnnet og protonet som vekselvirker. Tallene i parentes angir den absolutte usikkerheten i siste siffer.

Tensor	Utbyttbar	Prinsipal-verdier [MHz]	Egenvektor			Isotrop-verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Avviks-vinkel ^a [grader]
			<a>		<c>			
#3	Ja	95.00 (2)	.7855 (7)	.4775 (15)	-.3936 (16)	85.31 (1)	9.69 (2)	4.4 ¹
		83.69 (2)	.5385 (13)	-.8408 (10)	.0548 (15)		-1.62 (2)	
		77.25 (2)	.3048 (7)	.2551 (17)	.9176 (3)		-8.06 (2)	
#5	Nei	128.05 (2)	.0950 (13)	-.4786 (15)	-.8729 (36)	120.73 (1)	7.32 (2)	2.6 ²
		119.11 (2)	.9265 (9)	-.2783 (30)	.2533 (11)		-1.62 (2)	
		115.04 (2)	.3641 (6)	.8328 (24)	-.4170 (12)		-5.69 (2)	
#6	Nei	-89.08 (5)	.4888 (6)	.8664 (6)	.1019 (3)	-53.67 (3)	-35.42 (6)	5.4 ³ 19.3 ⁴
		-51.97 (4)	.6484 (3)	-.2827 (7)	-.7069 (6)		1.7 (5)	
		-19.95 (4)	.5837 (7)	-.4116 (5)	.6999 (5)		33.72 (5)	
#7	Ja	51.03 (2)	.3835 (9)	.8913 (104)	.2420 (35)	39.16 (1)	11.87 (2)	6.4 ⁵
		33.81 (2)	.3031 (4)	-.3690 (35)	.8786 (49)		-5.35 (2)	
		32.64 (2)	.8724 (8)	-.2636 (50)	-.4117 (104)		-6.52 (2)	

^aKrystallografiske retninger:

1. H5···C2	.7369	.5139	-.4391
2. H10···C2	.0945	-.4372	-.8944
3. C2-C1	.6650	-.1906	-.7221
4. H8-C2	.7342	-.5296	.4249
5. H4···C2	.3669	.9204	.1354

I og med at dette radikalets spinn vekselvirker med et α -proton, kan både McConnell-relasjonen [28] (ligning 2.29) for α -koblingens isotropverdi og Bernhard/Gordy-relasjonen [29, 30] (ligning 2.30) for α -koblingens mest positive anisotrope komponent brukes til å beregne spinntettheten i p-orbitalen på C2.

$$a_{\alpha,iso} = Q_{iso}^{\alpha} \rho^{\pi} \Rightarrow \rho^{\pi} = \frac{a_{\alpha,iso}}{Q_{iso}^{\alpha}} = \frac{-53.67 \text{ MHz}}{-72 \text{ MHz}} = 0.75$$

$$a_{\alpha,aniso} = Q_{aniso}^{\alpha} \rho^{\pi} \Rightarrow \rho^{\pi} = \frac{a_{\alpha,aniso}}{Q_{aniso}^{\alpha}} = \frac{33.72 \text{ MHz}}{38.7 \text{ MHz}} = 0.87$$

hvor $Q_{iso}^{\alpha} = -72 \text{ MHz}$ for et plant $C_{\alpha} - H_{\alpha}$ system og $Q_{aniso}^{\alpha} = 38.7 \text{ MHz}$ [29]. Spinntettheten beregnet ut fra α -koblingens isotropverdi, $\rho^{\pi} = 0.75$, er 13.8 % mindre enn spinntettheten beregnet ut fra dens største anisotrope verdi, $\rho^{\pi} = 0.87$. Verdien for konstanten Q_{iso}^{α} er basert på antagelsen om et plant system, og spinntettheten beregnet ut fra denne vil være følsom for avvik fra nettopp denne forutsetningen. En forskjell på 13.8 % tyder derfor på at det er en viss bøyning av systemet, som vil forekomme når C2 bare delvis

har rehybridisert til sp^2 . Siden isotropverdien er følsom for slike avvik fra planaritet, brukes derfor spinnthet basert på den mest positive anisotrope komponenten til videre beregninger [31].

Det er også observert vekselvirkninger med tre β -koblinger. To av disse er koblinger med protoner bundet til N1, mens den siste er en kobling til protonet bundet til karbonet C3. Ved å bruke spinnthet gitt fra beregninger med α -protonet, kan nå dihedralkvinkelen til alle disse koblingene anslås ved å benytte Heller-McConnell-relasjonen [32] (ligning 2.31). Kobling #5 viser vekselvirkning med β -protonet H10 som er bundet til karbon, $C_\alpha - C - H_\beta$, og dermed er konstantene i relasjonen gitt ved $B_0 = 0 \text{ MHz}$ og $B_2 = 126 \text{ MHz}$ [34]. Heller-McConnell-relasjonen gir da:

$$a_{\beta,iso} = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta_{H10}) \rho^\pi$$

$$120.73 = (0 + 126 \cdot \cos^2 \theta_{H10}) \cdot 0.87 \quad \Rightarrow \quad \cos \theta_{H10} = 1.05$$

Dette er en ugyldig løsning. Beregningene er basert på gitte forutsetninger (bl.a. sp^2 -hybridisering av det sentrale karbonatomet) og parametere som representerer middelverdier av eksperimentelle data, med relativt store spredninger. For eksempel er $B_0 = 0$ en approksimasjon, idet flere ulike verdier mellom +15 og -10 MHz finnes i litteraturen. Avviket kan også skyldes ikke-planaritet rundt radikalsenteret [58]. Det antas da at $\cos \theta$ har en verdi nær 1, og at dihedralkvinkelen til H10 derfor er svært nær null grader. Ettersom C3 er sp^3 hybridisert, vil de tre bindingene til H9, H10 og C4, sett fra spinnets sted, danne en vinkel på omlag 120° med hverandre. Med $\theta_{H10} \approx 0^\circ$ vil da dihedralkvinkelen til det andre β -protonet H9 ligge på omtrent $\theta_{H9} \approx 60^\circ$. Dette vil, ut fra Heller-McConnell-relasjonen gi en isotropverdi på:

$$a_{H9,iso} = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta_{H9}) \rho^\pi = (0 + 126 \cdot \cos^2(60^\circ)) \cdot 0.87 = 27.4 \text{ MHz}$$

Med tanke på at det for β -protoner er den isotrope vekselvirkningen som er dominerende over den anisotrope, vil den totale hfvv-en med H9 maksimalt ha en verdi litt høyere enn 27.4 MHz , men også ha verdier i nærheten og mindre enn dette. Dette betyr at koblingen til H9 ved de fleste orienteringer vil sentreres rundt fri-proton frekvensen, men at det ved noen orienteringer kunne ha vært mulig å observert den eksperimentelt. Denne verdien for hfvv-en

med H9 er kun et estimat og vil trolig avvike noe fra den faktiske verdien av den grunn av at verdiene for både $\theta_{H10} \approx 0^\circ$ og $\theta_{H9} \approx \theta_{H10} + 120^\circ$ er tilnærmelser.

Kobling #3 og #7 viser spinnvekselvirkninger med de utbyttbare β -protonene H5 og H4 bundet til nitrogenet N1, $C_\alpha - N - H_\beta$. Konstantene som benyttes i Heller-McConnell-relasjonen er da $B_0 = -4.3$ og $B_2 = 117.6 \text{ MHz}$ [33]. N1 er sp^3 hybridisert, og de fire bindingene ut fra den danner derfor en tilnærmet tetraheder. Spinnet er lokalisert til C2, og sett fra dets sted mot N1, vil de tre protonene H3, H4 og H5 danne 120° med hverandre. Vekselvirkningen med H5 har størst isotropverdi, så denne forventes å ha minst dihedralvinkel:

$$\begin{aligned} a_{\beta,iso} = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho^\pi &\Rightarrow a_{H5,iso} = 85.31 = (-4.3 + 117.6 \cdot \cos^2 \theta_{H5}) \cdot 0.87 \\ &\Rightarrow \theta_{H5} = 21.1^\circ \end{aligned}$$

Ut fra dette resultatet kan dihedralvinklene til de to andre protonene bundet til N1, H4 og H3, estimeres til å være omtrent $\theta_{H4} = 38.9^\circ$ og $\theta_{H3} = 81.1^\circ$. Dihedralvinkelen til H4 kan også beregnes ut fra eksperimentelle avlesninger ved å bruke isotropverdien til kobling #7:

$$\begin{aligned} a_{\beta,iso} = (B_0 + B_2 \cos^2 \theta) \rho^\pi &\Rightarrow a_{H4,iso} = 39.16 = (-4.3 + 117.6 \cdot \cos^2 \theta_{H4}) \cdot 0.87 \\ &\Rightarrow \theta_{H4} = 49.6^\circ \end{aligned}$$

θ_{H4} beregnet ut fra isotropverdien ligger vel 10° unna θ_{H4} estimert ut fra θ_{H5} . Det er naturlig med et visst avvik mellom disse vinklene, både ut fra at beregningene av vinkler baserer seg på eksperimentelle parametere med en viss usikkerhet og at det i praksis kun er tilnærmet 120° mellom koblingene. Når det gjelder det siste protonet bundet til N1, H3, så ble ikke dets spinnvekselvirkning observert eksperimentelt. Dihedralvinkelen θ_{H3} estimert ut fra θ_{H5} ligger omkring 80° , og estimert ut fra θ_{H4} omkring 70° . Begge disse vinklene er så nær 90° at den forventede hyperfinkoblingen blir så liten at den ikke lar seg måle eksperimentelt i dette studiet.

Dihedralvinklene til de fem mulige β -protonene til radikal LIII beregnet ut fra eksperimentelle data er vist i tabell 4-15 sammen med de tilsvarende dihedralvinklene i et uskadd L-asparaginmolekyl beregnet ut fra bindingsretninger i molekylet. I dihedralvinkelberegningene ut fra bindingsretninger er retningen til spinnorbitalen satt lik

bindingsretningen C2-C1. Det er et godt samsvar mellom dihedralkvinklene i radikal LIII og de beregnet ut fra den uskadde krystallstrukturen.

Tabell 4-15: Sammenligning av dihedralkvinklene til de mulige β -protonene i radikal LIII og et uskadd L-asparaginmolekyl. Dihedralkvinklene i radikalet er beregnet på bakgrunn av eksperimentelle observasjoner, mens dihedralkvinklene i det uskadde molekylet er beregnet ut fra bindingsretninger.

	θ_{H9} [grader]	θ_{H10} [grader]	θ_{H3} [grader]	θ_{H4} [grader]	θ_{H5} [grader]
Radikal LIII	60°	0°	70 – 80°	49.6°	21.1°
Uskadd molekyl	67.6°	3.8°	84.5°	38.1°	24°

4.2 Molekylstrukturberegninger

Utgangspunktet for DFT-beregningene på L-asparagin er de tre lavtemperaturradikalene foreslått ut fra eksperimentelle analyser. I det følgende vil det presenteres resultater fra molekylstrukturberegninger på ett radikal av gangen, og deretter vil disse teoretiske hfvv-tensorene sammenliknes med de tensorene som er etablert ut fra eksperimentelle observasjoner.

4.2.1 LI

For det som er antatt å være et protonert amid-anionet med spinnnet lokalisert til C4 ble det eksperimentelt observert to β -koblinger. Mangel på en vesentlig del av bredden i EIE-spekteret i kun vanlige krystaller antyder at spinnnet også vekselvirker med ytterligere en eller to utbyttable β -protoner. Det er sju forskjellige hydrogenbindinger som linker de asymmetriske enhetene i enhetscellen sammen. O3 inngår i én hydrogenbinding til nabomolekylets aminoprotein H5 (heretter H5') og hvor avstanden mellom dem er 1.75 Å. En forflytning av H5' fra radikalets nabomolekyl langs hydrogenbindingen er da en potensiell protonering av O3, og den føringen som ble lagt ved DFT-beregningene. Radikalet ble plassert på den første asymmetriske enheten i enhetscellen, spinnmultiplisitet ble satt lik 2 og totalladningen ble satt lik -1 fordi radikalet er et resultat av en reduksjonsprosess. H5' ble overført til O3 ved å forkorte avstanden mellom O3...H5' fra 1.75 Å til 1 Å, ved å legge en føring på geometrioptimeringen. Retningen mellom O3 og H5' ligger ikke i nodalplanet til spinnorbitalen, og siden det eksperimentelt ikke ble observert noen vekselvirkning med det overførte protonet ble det derfor også utført beregninger både hvor H5' på forskjellige måter

ble bikket ned i nodalplanet samt beregninger hvor H5' ble ført tilbake til nabomolekylet. Ingen av disse ekstra føringene ga gode resultater etter optimalisering, H5' ble ikke værende i nodalplanet, og spinnets ble fordelt jevnt utover krystallen ved tilbakeføring av H5'. Radikalstrukturen ble derfor laget med kun denne ene føringen hvor avstanden O3...H5' ble satt lik 1 Å. Etter at radikalstrukturen var etablert, ble den optimert ved at alle føringer ble fjernet, og det er dette resultatet som presenteres i oppgaven.

Molekylstrukturberegningene ga et resultat i samsvar med eksperimentelle data og analyse av LI. Spinnet ble lokalisert til C4 og vekselvirket både med H9 og H10. Hfvv-tensorer for radikal LI er ført opp i tabell 4-16, hvor det beregnede avviket mellom modellerte og eksperimentell observerte maksimale prinsipalretninger også er vist. Avviket mellom retningene for vekselvirkningen med H9 (kobling #1) er lik 2.9° og mellom retningene for vekselvirkningen med H10 (kobling #8) lik 0.2°. At DFT-beregningen i stor grad samsvarer med de eksperimentelle målingene, underbygger konklusjonene av både struktur og dannelse av radikal LI, ettersom DFT-beregningene baserer seg på nettopp disse. DFT-beregningene ga, i tillegg til koblingene observert eksperimentelt, to ekstra koblinger av betydelig størrelse. Disse er også ført opp i tabell 4-16. Den ene representerer spinnets vekselvirkning med det utbyttbare amid-protonet H6 som er bundet til N2 i sidekjeden til L-asparagin. H6 ligger to sigmabindinger unna C4, så koblingen er en β -kobling. Det andre amid-protonet, H7, fikk en veldig liten isotrop vekselvirkning av den grunn av at det ligger nær i nodalplanet til spinnorbitalen. Den andre ekstra vekselvirkningen som observeres ved DFT-modelleringen er med H5'. Dette er en stor isotrop β -kobling, og siden H5' i utgangspunktet var bundet til et nitrogenatom er det utbyttbart. De to ekstra koblingene gitt ved DFT-beregningene kan gjøre rede for oppsplittingen og bredden av EIE-spekteret til radikal LI. Hfvv-tensorer for vekselvirkningene med alle kjernene i L-asparagin med spinn forskjellige fra null er lagt ved i appendiks D, tabell D.1.

Bildet til venstre i figur 4-23 viser DFT-modellert struktur til radikal LI. Her vises det overførte protonets beliggenhet i forhold til resten av radikalet. Bildet til høyre i figur 4-23 viser i hvilken grad geometrien til L-asparagin forandret seg ved dannelse av radikal LI. Skyggelagt område viser strukturen til et uskadd L-asparaginmolekyl. Det ser ut til å ha skjedd en liten grad av bøyninger i sidekjeden til L-asparagin, noe som forventes å skje ved radikaldannelse. Figur 4-24 illustrerer spinn tetthetsfordelingen til radikal LI. Som forventet er størstedelen av spinnet lokalisert i p-orbitalen til den nær sp^2 -hybridiserte C4. Noe av

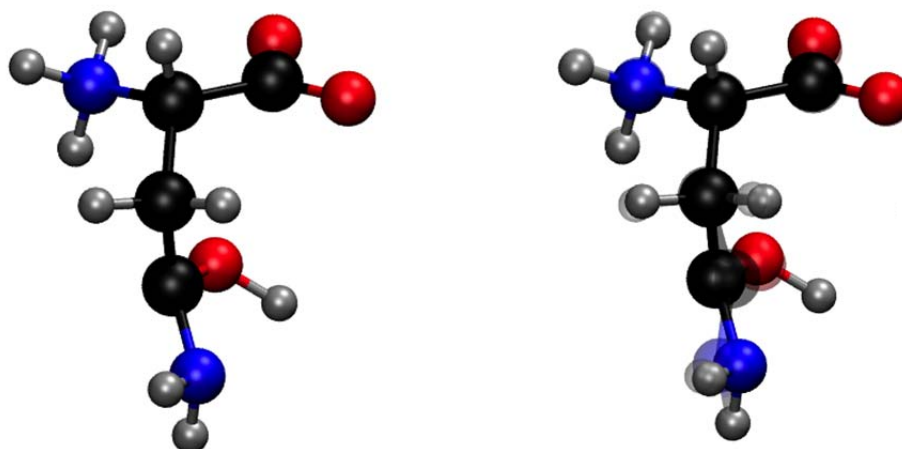
spinnet er også lokalisert til N2. Spinntettheten er ut fra DFT-beregningene 0.71 på C4 og 0.12 på N2.

Tabell 4-16: Hfvv-tensorer funnet ved DFT-beregninger på radikal LI sammen med de samsvarende hfvv-tensorene etablert eksperimentelt. Tabellen viser hvilke protoner modelleringen ga betydelige spinnvekselvirkninger med, samt avviket mellom de modellerte og eksperimentelt etablerte retningene for A_{\max} . Tallene i parentes angir usikkerheten i siste siffer.

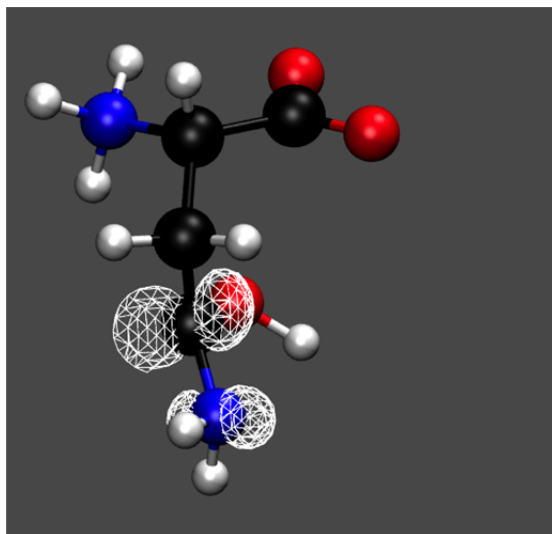
Proton	DFT-resultater						Eksperimentelle resultater		
	Isotrop-verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor			Avviks- vinkel ^a [grader]	Isotrop- verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Tensor
			<a>		<c>				
H6	22.3	13.9	-.827	.186	-.531				
		-5.3	.500	.676	-.541				
		-8.6	-.258	.713	.652				
H9	76.4	7.0	.388	-.728	.565	2.9 ¹	81.76 (1)	6.93 (2)	#1
		-2.2	.734	.615	.287			-2.07 (2)	
		-4.8	-.557	.304	.773			-4.86 (2)	
H10	35.6	10.0	.856	-.509	.095	0.2 ²	36.67 (2)	10.33 (4)	#8
		-4.1	-.499	-.762	.413			-3.84 (4)	
		-5.9	.138	.401	.906			-6.53 (4)	
H5'	42.1	12.6	.975	-.174	-.139				
		-4.8	-.200	-.410	-.890				
		-7.8	-.097	-.895	.435				

^aEksperimentelle retninger:

1. A_{\max} kobling #1 .4168 -.6925 .5888
2. A_{\max} kobling #8 .8564 -.5071 .0972



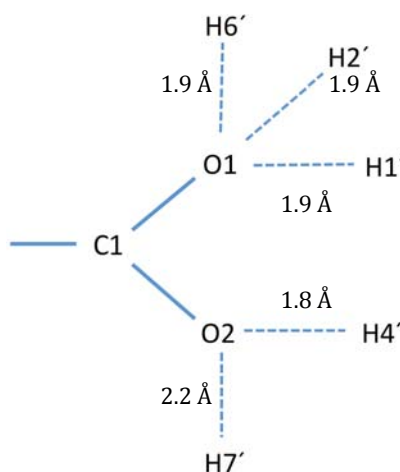
Figur 4-23: Figuren til venstre viser modellert struktur av radikal LI. Figuren til høyre viser geometriforskjeller mellom intakt struktur av L-asparagin (skyggelagt) og radikal LI. Svarte atomer er karbon, blå atomer er nitrogen, røde atomer er oksygen og sølvfargede atomer er hydrogen.



Figur 4-24: Spinntetthetsfordelingen på radikal LI. Svarte atomer er karbon, blå atomer er nitrogen, røde atomer er oksygen og sølvfargede atomer er hydrogen.

4.2.2 LII

For det antatte protonerte karboksyl-anionet med spinnnet lokalisert til C1 ble det eksperimentelt observert én β -kobling. Observasjon av en ekstra oppsplitting i EIE-spektre fra $\langle c \rangle$ -aksen i vanlig krystall antyder at spinnnet også vekselvirker betydelig med ytterligere en kjerne. Ved DFT-beregninger på LII ble radikalet plassert på den andre asymmetriske enheten i enhetscellen, fordi dette førte til at det ble mindre komplisert å legge føringer på de mange hydrogenbindingene karboksylgruppen inngår i. Spinnmultiplisiteten ble satt lik 2 og totalladningen ble satt lik -1 som et resultat av reduksjonsprosessen. Krystallografiske data viser at de to oksygenatomene, O1 og O2, i karboksylgruppen inngår i til sammen fem hydrogenbindinger med molekylerne som omgir dem, se figur 4-25. Alle disse fem er til utbyttbare protoner. O1 er linket til vannprotonet H1 i samme asymmetriske enhet, vannprotonet H2 (kalles H2') i et nabomolekyl og amidprotonet H6 (kalles H6') i nok et annet nabomolekyl. O2 er linket til aminoprotonet H4 (kalles H4') i et nabomolekyl og aminoprotonet H7 (kalles H7') i sidekjeden til et annet nabomolekyl. Det er utført DFT-beregninger på alle de fem mulige protonoverføringene. Alle resultatene ga to betydelige hfvv-tensorer for radikalstrukturen etablert med føringer på GPW-nivå. Den ene skyldes den samme vekselvirkningen som kobling #2. Den andre representerer spinnets vekselvirkning med det overførte protonet.



Figur 4-25: Skisse over hvilke hydrogenbindinger atomene i karboksylgruppen inngår i. Alle disse fem representerer mulige protonoverføringer i radikal LII og alle fem inkluderer utbyttbare protoner. Bindingslengder i figuren er ikke korrekt gjengitt.

To av mulighetene, H2' overført til O1 og H7' overført til O2, gir spinn på rett plass men en større hfvv med det overførte protonet enn forventet ut fra bredden i EIE-spekteret. Det ble derfor for disse to mulighetene forsøkt å bikke det overførte protonet ned i nodalplanet til spinnorbitalen, for å gjøre vekselvirkningen mindre. Da disse geometriene ble sluppet fri for føringer fulgt av en ny optimalisering, bikket H2' opp igjen fra planet, mens H7' gikk tilbake til nabomolekylet og spinnnet ble fordelt jevnt utover krystallen. Dette tyder da på at ingen av disse mulighetene er løsninger for radikal LII. For muligheten hvor H6' overføres til O1, ble ikke H6' værende på radikalet ved optimering fri for føringer på GAPW nivå, noe som resulterte i at spinnnet ikke ble lokalisert til C1. Hfvv-tensorer for vekselvirkninger med alle kjernene i L-asparagin med spinn forskjellige fra null for de to resterende mulige protonoverføringene, H1...O1 og H4'...O2, er lagt ved i appendiks D, henholdsvis i tabell D.2 og D.3. Disse gir begge spinn på C1, og en akseptabel størrelse på hfvv-en til det overførte protonet. Likevel viste det seg at løsningen hvor O2 protoneres av H4' ga det beste resultatet, både når det gjaldt størrelsen på spinnets vekselvirkning med H8 og med H4', og velges derfor å presenteres denne oppgaven. Hfvv-tensorer fra beregningen med H4'-protonering av O2 er vist i tabell 4-17, hvor det beregnede avviket mellom den modellerte og den eksperimentell observerte maksimale prinsipalretningen også er vist. Denne beregningen ga en isotrop verdi for H8 veldig nær den eksperimentelt observerte, samt stor nok isotropverdi for vekselvirkningen med det overførte protonet til at det kan ha en betydning for EIE-spekterbredden og forårsake den ekstra oppsplittingen av den store dubletten som observeres i EIE-spektre langs $\langle c \rangle$ -aksen (figur 4-14 kapittel 4.1.5). H4' ble overført til O2 ved å legge en føring på avstanden mellom O2...H4', som ble endret fra 1.8 Å

til 1 Å, og etter at radikalstrukturen var etablert ble den optimert ved at alle føringer ble fjernet, og det er dette resultatet som presenteres i oppgaven. Vinkelavviket for vekselvirkningen med H8 (kobling #2) er på 1.5°.

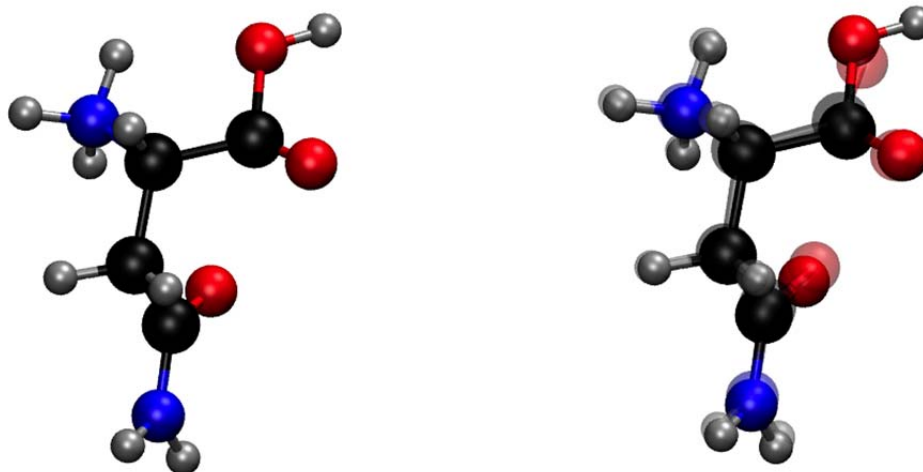
Tabell 4-17: Hfvv-tensorer funnet ved DFT-beregninger på radikal LII sammen med den samsvarende hfvv-tensoren etablert eksperimentelt. Resultatene er basert på beregninger med at O2 protoneres av H4. Tabellen viser hvilke protoner modelleringen ga betydelige spinnvekselvirkninger med, samt avviket mellom den modellerte og eksperimentelt etablerte retningen for A_{\max} til kobling #2. Tallene i parentes angir usikkerheten i siste siffer.

Proton	Isotrop-verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor			Avviks- vinkel ^a [grader]	Isotrop- verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Tensor
			<a>		<c>				
H8	63.6	7.2	-.874	.388	-.292	1.5 ¹	65.29 (1)	7.37 (2)	#2
		-2.7	-.027	.561	.828			-2.53 (2)	
		-4.6	-.485	-.732	.480			-4.85 (2)	
H4'	11.9	16.2	.299	-.548	.781				
		-7.2	-.946	-.063	.319				
		-9.1	.126	.834	.538				

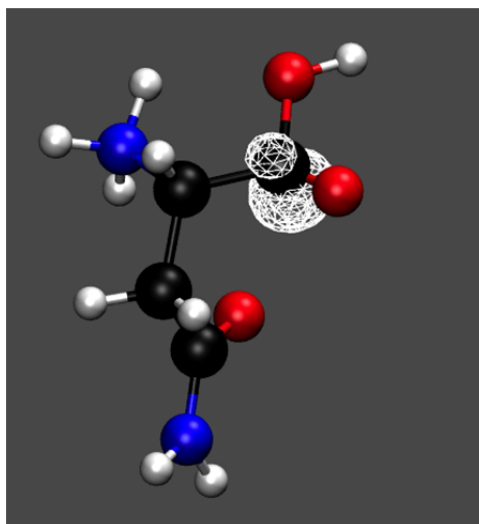
^aEksperimentelle retninger:

1. A_{\max} kobling #2 -.8798 .3642 -.3056

DFT-beregningene ga et resultat i samsvar med eksperimentelle data og analyse av LII. Bildet til venstre i figur 4-26 viser strukturen til radikal LII modellert med DFT. Her vises det overførte protonets beliggenhet i forhold til resten av radikalet. Bildet til høyre i figur 4-26 viser i hvilken grad geometrien til L-asparagin forandrer seg når radikal LII dannes. Skyggelagt område illustrerer strukturen til et uskadd L-asparaginmolekyl. Det ser ut til å ha skjedd bare en liten grad av geometriforandring, men mest i karboksylgruppen. Størstedelen av spinnet ble lokalisert i p-orbitalen til det nær sp^2 -hybridiserte C1 med en spinntetthet på 0.73. Figur 4-27 illustrerer spinntetthetsfordelingen til radikal LII. Figuren antyder at karboksylgruppen ikke er plan, men har en noe pyramidal form.



Figur 4-26: Figuren til venstre viser modellert struktur av radikal LII. Figuren til høyre viser geometriforskjeller mellom intakt struktur av L-asparagin (skyggelagt) og radikal LII. Svarte atomer er karbon, blå atomer er nitrogen, røde atomer er oksygen og sølvfargede atomer er hydrogen.

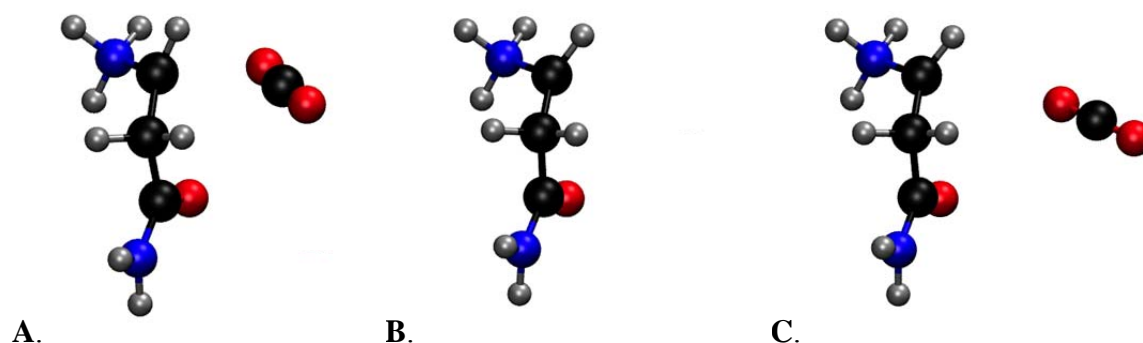


Figur 4-27: Figuren viser spinn tetthetsfordelingen på radikal LII. Svarte atomer er karbon, blå atomer er nitrogen, røde atomer er oksygen og sølvfargede atomer er hydrogen.

4.2.3 LIII

For dekarboksyleringsproduktet ble det eksperimentelt observert et spinn lokalisert til C2 som vekselvirker med de tre β -protonene H4, H5 og H10, og med α -protonet H8. DFT-beregningene på LIII ble gjort på asymmetrisk enhet nummer én i enhetscellen, spinnmultiplisiteten satt lik 2 og totalladning på +1, som et resultat av oksidasjonsprosessen. For å modellere radikal LIII ble det gjort tre forskjellige tilnærminger kalt **A**, **B** og **C**, se figur 4-28. **A** gikk ut på å øke bindingslengden C1-C2 fra ca. 1.5 Å til 3 Å for å simulere

bindingsbruddet nettopp der. Dette resulterte ikke i en struktur som var stabil under geometrioptimering med GAPW-metoden for å beskrive alle elektronene eksplisitt. Da radikalstrukturen med føringer var stabilisert, ble geometrien til denne tilnærmingen derfor kun optimalisert fri for føringer med GPW-metoden, og hfvv-tensorene beregnet for denne geometrien ved å bruke GAPW-metoden uten geometrioptimering. Tilnærming **B** gikk ut på å fjerne radikalets karboksylgruppe fra enhetscellen¹³. I tilnærming **C** ble karboksylgruppen flyttet manuelt ved å beregne nye koordinater for C1, O1 og O2. Oksygenmolekylene ble forskjøvet 1 Å unna molekylet i retning av C2-C1 bindingen, og karboksylgruppen ble gjort lineær ved å plassere karbonatomet midt mellom dem. Hele den lineære karboksylgruppen ble deretter flyttet 1.3 Å i O2···O1 retningen, for at den skulle komme langt nok vekk til å stabilisere seg ved påfølgende geometrioptimeringer. For å stabilisere strukturen ble det først utført geometrioptimeringer hvor avstanden på 3.44 Å mellom C1 og C2 ble holdt fast med en føring, før geometrien til slutt bli sluppet fri fra føringer.



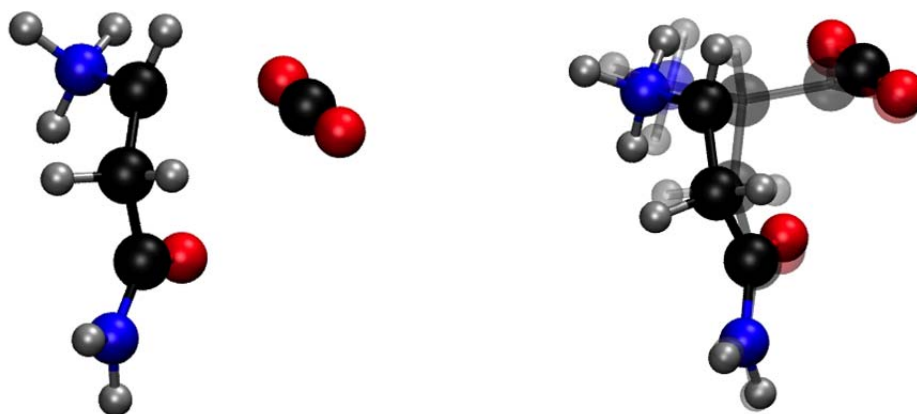
Figur 4-28: De tre forskjellige tilnærmingene til molekylstrukturberegninger for LIII, som beskrevet i teksten.

Hfvv-tensorer for vekselvirkninger med alle kjernene i L-asparagin med spinn forskjellige fra null er for alle de tre tilnærmingene lagt ved i appendiks D, tabell D.4, D.5 og D.6 for henholdsvis **A**, **B** og **C**. Tilnærmingene **B** og **C** ga et ganske likt og relativt bra resultat for de modellerte tensorene. Noen av isotropverdiene til koblingene avviker en del med isotropverdiene til de eksperimentelt baserte tensorene. De anisotrope verdiene er noe bedre. **B** og **C** ga på grunn av geometriforandringer ytterligere en vekselvirkning av betydelig størrelse med β -protonet H3 i tillegg til de eksperimentelt observerte. Da EIE-spekterbredden ikke ga forventning om en ytterligere kobling, er det valgt å presentere tilnærming **A** i denne

¹³ Denne tilnærmelsen er kanskje ikke den mest fysisk rimelige, siden det mest sannsynlig ikke er nok termiske energi ved 6 K til at karboksylgruppen kan diffundere ut av krystallen, men er likevel valgt å gjennomføre for å få data til sammenligninger.

oppgaven. Beregningsmetode **A** ga et spinn lokalisert til C2 og betydelig vekselvirkning med H4, H5, H8, og H10. De beregnede tensorene for tilnærming **A** er gitt i tabell 4-18, hvor det også er ført opp vinkelavvik mellom de aktuelle eksperimentelle prinsipalretningene og de modellerte. For beregning av retningsavvik med kobling #5 (til H10) er det valgt en annen fortegnskombinasjon ((+ + +) for A_{\max}) for den valgte Schonlandvarianten av tensoren. Grunnen for dette er at det var forskjell mellom fortegnene som DFT-beregningen ga og fortegnene til den krystallografiske retningen H10 \cdots C2. De meget små avvikene mellom aktuelle retningsvektorer viser en god overenstemmelse mellom modellerte og eksperimentelle retninger for tensorene.

Bildet til venstre i figur 4-29 viser strukturen til radikal LIII modellert ut fra DFT-resultatene. Her vises karboksylgruppens beliggenhet i forhold til resten av radikalet. Bildet til høyre i figur 4-29 viser i hvilken grad geometrien til L-asparagin forandrer seg når radikal LIII blir dannet. Skyggelagt område viser strukturen til et uskadd L-asparaginmolekyl. Ettersom C2 rehybridiserer fra sp^3 til sp^2 , forventes geometriforskjeller mellom radikalet og den intakte strukturen. Figur 4-30 illustrerer spinntetthetsfordelingen til radikal LIII. DFT-beregningene ga spinntetthet lik 0.89 i p-orbitalen til det sp^2 -hybridiserte C2.



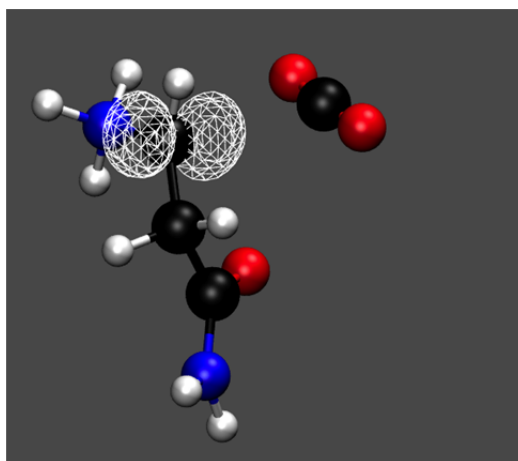
Figur 4-29: Figuren til venstre viser modellert struktur av radikal LIII. Figuren til høyre viser geometriforskjeller mellom intakt struktur av L-asparagin (skyggelagt) og radikal LIII. Svarte atomer er karbon, blå atomer er nitrogen, røde atomer er oksygen og sølvfargede atomer er hydrogen.

Tabell 4-18: Hfvv-tensorer funnet ved DFT-beregninger for radikal LIII sammen med de samsvarende hfvv-tensorene etablert eksperimentelt. DFT-resultatene er basert på beregningsmetode A. Tabellen viser hvilke protoner modelleringen ga betydelige hfvv-er med, samt avviket mellom de modellerte og eksperimentelt etablerte retningene for A_{\max} til kobling #3, #5 og #7, og avviket med egenvektorene til prinsipalveridene til kobling #6. Tallene i parentes angir usikkerheten i siste siffer.

DFT-resultater							Eksperimentelle resultater		
Proton	Isotrop-verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor			Avviks- vinkel ^a [grader]	Isotrop- verdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Tensor
			<a>		<c>				
H4	40.9	11.4	.391	.882	.261	1.3 ¹	39.16 (1)	11.87 (2)	#7
		-5.1	.045	-.302	.952			-5.35 (2)	
		-6.3	.919	-.361	-.158			-6.52 (2)	
H5	85.9	9.5	.845	.402	-.354	6.0 ²	85.31 (1)	9.69 (2)	#3
		-1.4	-.443	.896	-.039			-1.62 (2)	
		-8.1	.301	.190	.935			-8.06 (2)	
H8	-37.3	-35.4	.490	.858	.156	3.2 ³	-53.67 (3)	-35.42 (6)	#6
		-2.6	.667	-.253	-.701	1.9 ⁴		1.7 (5)	
		38.0	.562	-.448	.696	2.5 ⁵		33.72 (5)	
H10	121.2	7.2	.031	.444	.895	4.7 ⁶	120.73 (1)	7.32 (2)	#5
		-1.5	.940	.293	-.178			-1.62 (2)	
		-5.7	-.342	.847	-.409			-5.69 (2)	

^aEksperimentelle retninger:

1. A_{\max} kobling #7	.3835	.8913	.2420
2. A_{\max} kobling #3	.7855	.4775	-.3936
3. A_{\max} kobling #6	.4888	.8664	.1019
4. A_{int} kobling #6	.6484	-.2827	-.7069
5. A_{\min} kobling #6	.5837	-.4116	.6999
6. A_{\max} kobling #5	.1018	.4783	.8723



Figur 4-30: Figuren viser spinntetthetsfordelingen på radikal LIII. Svarte atomer er karbon, blå atomer er nitrogen, røde atomer er oksygen og sølvfargede atomer er hydrogen.

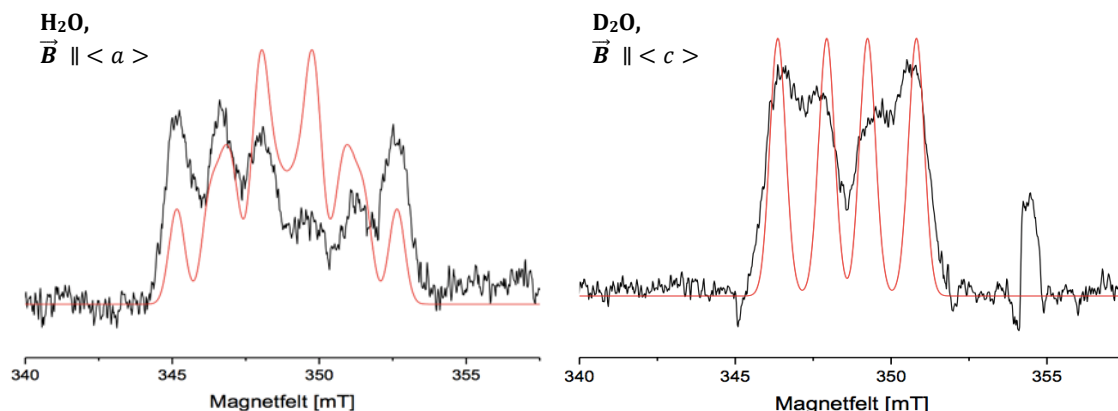
4.3 Simulering av EPR-absorpsjonsspektre

Tensorer funnet ved eksperimentell analyse sammen med supplerende tensorer funnet ved DFT-beregningene, er sammen benyttet for å forsøke å simulere EPR-absorpsjonsspektre for sammenligning med de eksperimentelle EIE-spektrene for de tre radikalene. Sammenligningen av både bredden av spekteret og hyperfinstrukturen ved ulike orienteringer i magnetfeltet gir en indikasjon på kvaliteten til de eksperimentelle og de kompletterende teoretiske data, og dermed også til radikalstrukturene som er foreslått. Det er valgt å benytte de eksperimentelle tensorene der de er etablert fremfor de tilsvarende tensorene funnet ved DFT-beregningene av den grunn av at det aldri er en perfekt overenstemmelse mellom DFT-resultatene og de eksperimentelle resultatene. Det spesielt ofte er et relativt stort avvik mellom eksperimentell og modellert isotropverdi [10, 59]. Om det til simuleringer av EPR-absorpsjonsspektre benyttes en modellert tensor hvor avviket med korrekt isotropverdi er stor, vil det føre til avvik i sammenligningen med de eksperimentelle EIE-spektrene.

4.3.1 LI

Radikal LI sitt simulerte EPR-absorpsjonsspekter for en vanlig L-asparaginkrystall er basert på de eksperimentelle observerte tensorene #1 og #8, samt de to tensorene funnet ved DFT-beregningene som representerer vekselvirkninger til H6 og H5'. Figur 4-31 viser simulerte spektre sammen med de sammenlignbare EIE-spektre for radikal LI. De eksperimentelle opptakene ga kun gode EIE-spektre ved magnetfeltet parallelt med $\langle a \rangle$ -aksen for en vanlig krystall, og plottet til venstre i figur 4-31 viser derfor dette spekteret sammenlignet med simuleringen ved denne aksens. Denne figuren illustrerer at det er en god overenstemmelse mellom det eksperimentelt målte spekteret og det simulerte. Både bredden av spektrene og hyperfinstrukturen stemmer godt overens. Det tyder da på at tensorene som ligger til grunn for simuleringen representerer vekselvirkningene i dette radikalet godt.

Ettersom to av koblingene til dette radikalet (de to som ikke ble observert eksperimentelt i ENDOR, men bare i EIE) er vekselvirkninger med utbyttbare protoner, skal i prinsippet et simulert EPR-absorpsjonsspekter langs $\langle c \rangle$ -aksen med kun tensor #1 og #8 ligne det ene deuterte EIE-spekteret observert for radikal LI tatt ved tilsvarende akse. Dette vises i plottet til høyre i figur 4-31. Her stemmer også både bredden og oppsplittingene i spektrene godt overens. Oppsplittingen er redusert til fire tydelige linjer, akkurat som i det eksperimentelle EIE-spekteret. Dette understreker at tensorene basert på eksperimentelle observasjoner er gode, samt at de ekstra tensorene stammer fra utbyttbare protoner.

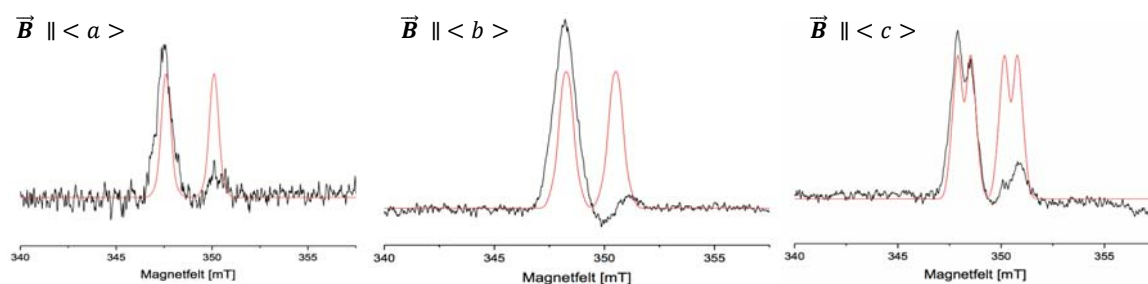


Figur 4-31: Sammenligning av EIE-spektre fra eksperimentelle opptak (svart linje) og simulerte EPR-absorpsjonsspektre (rød linje). Figuren til venstre viser et spekter med magnetfeltet rettet langs $\langle a \rangle$ -aksen i en vanlig krystall, hvor simuleringen inkluderer de to eksperimentelt observerte tensorene sammen med de to tensorene funnet ved DFT-beregninger. Figuren til høyre viser et spekter med magnetfeltet rettet parallelt med $\langle c \rangle$ -aksen i en deuterert krystall, hvor simuleringen inkluderer kun de eksperimentelt observerte tensorene. Mikrobølgefrequensene er 9.771 GHz for spekteret til venstre og 9.758 GHz for spekteret til høyre. De eksperimentelle EIE-spektrene er tatt opp ved ENDOR-frekvensen låst ved 55.13 MHz (kobling #1) for spekteret til en vanlig krystall og 55.58 MHz (kobling #1) for spekteret til en vanlig krystall.

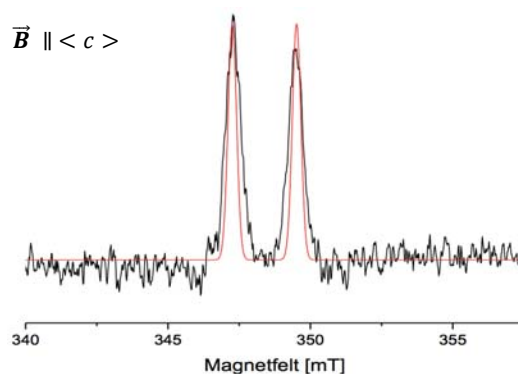
4.3.2 LII

For radikal LII er de simulerte EPR-absorpsjonsspektrene for en vanlig krystall basert på den eksperimentelt observerte tensoren #2, samt den tensoren som ble bestemt ved DFT-beregningene som viser vekselvirkning med det overførte protonet H4'. Figur 4-32 viser de eksperimentelle EIE-spektrene sammenliknet med de simulerte ved magnetfeltet rettet parallelt med alle tre aksene i en vanlig krystall. I alle tre plottene gir både bredden og hyperfinstrukturen av de simulerte spektrene god overenstemmelse med de eksperimentelt observerte spektrene. Det er kun ved den orienteringen hvor $\langle c \rangle$ -aksen er rettet parallelt med magnetfeltet at den store dubletten splittes ytterligere opp, noe som også det simulerte plottet viser.

I og med at det overførte protonet er utbyttbart, skal et simulert EPR-absorpsjonsspekter ut fra kun tensor #2 gi god overenstemmelse med det deutererte EIE-spekteret til radikal LII. Figur 4-33 viser det eksperimentelt observerte deutererte EIE-spekteret tatt ved $\langle c \rangle$ -aksen, sammenliknet med et simulert spekter. Begge spektrene viser her en litt smalere dublett, og hvor oppsplittingen, som var synlig i spekteret fra en vanlig krystall ved denne orienteringen, er forsvunnet. Denne gode overenstemmelsen mellom målte og simulerte spektre tyder på at de tensorene som er etablert for radikal LII er gode.



Figur 4-32: Sammenligning av EIE-spektre fra eksperimentelle opptak (svart linje) i en vanlig krystall og simulerte EPR-absorpsjonsspektre (rød linje) for de tre krystallografiske aksene rettet parallelt med magnetfeltet. De simulerte spektrene er basert på den ene eksperimentelt observerte tensoren #2 samt tensoren for det overførte protonet ($H4'$) funnet ved DFT-beregninger. Mikrobølgefrequensene er 9.763 GHz for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$, 9.779 GHz for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 9.781 GHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$. De eksperimentelle EIE-spektrene er tatt opp ved ENDOR-frekvenser tilsvarende kobling #2 låst ved henholdsvis 49.80 MHz, 46.29 MHz og 46.38 MHz.



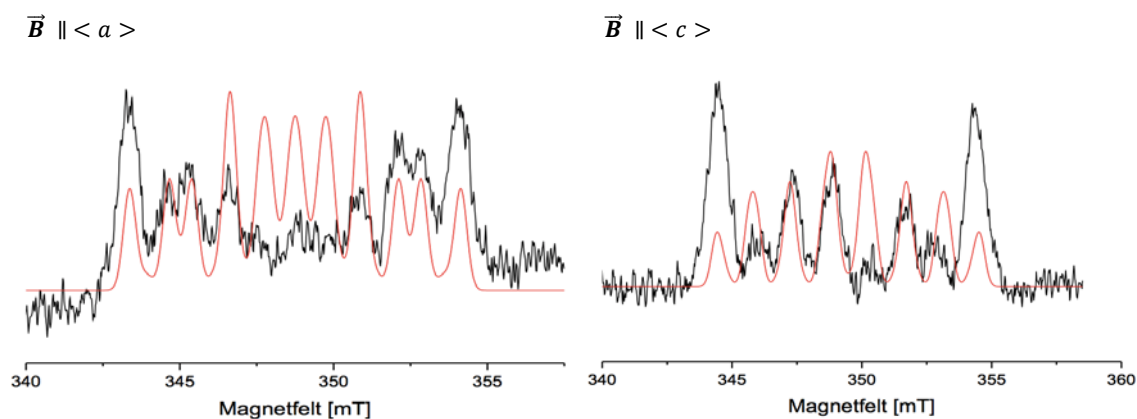
Figur 4-33: Sammenligning av EIE-spekteret fra eksperimentelt opptak (svart linje) i en deuterert krystall og simulert EPR-absorpsjonsspekter på bakgrunn av tensor #2 (rød linje) for magnetfeltet rettet parallelt med $\langle c \rangle$ -aksen. Mikrobølgefrequensen er 9.756 GHz. Det eksperimentelle EIE-spekteret er tatt opp ved ENDOR-frekvensen låst ved 46.39 MHz (tilsvarende kobling #2).

4.3.3 LIII

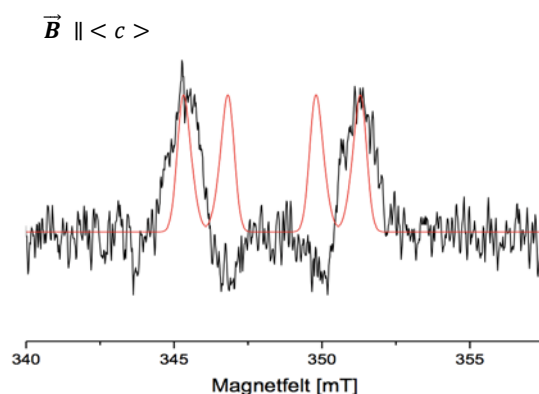
Simuleringen av EPR-absorpsjonsspektre for radikal LIII i vanlige L-asparaginkrystaller er kun basert på de eksperimentelle observerte tensorene #3, #5, #6 og #7. For tensor #5 er det valgt å bruke samme sett fortegn for prinsipalverdiene egenvektorer som resultatet for DFT-beregningene. Figur 4-34 viser de simulerte spektrene hvor magnetfeltet er rettet parallelt med $\langle a \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene til krystallen, sammenlignet med EIE-spektre for radikal LIII målt ved disse orienteringene. For $\langle a \rangle$ -aksen passer bredden og oppsplittingene av spektrene godt. Det er vanskelig å se hvordan det eksperimentelle EIE-spekteret er splittet opp i midtregionen, men de fire ytterste linjene på hver side samsvarer godt med det simulerte spekteret, både med antall og plasseringene av linjer. Når det gjelder $\langle c \rangle$ -aksen stemmer også bredden og oppsplittingene i de to spektrene godt.

To av de fire tensorene representerer vekselvirkninger med utbyttbare protoner. Det er derfor foretatt en simulering av et EPR-absorpsjonsspekter for en deutrert krystall ved å fjerne disse to tensorene. Figur 4-35 viser et spekter langs $\langle c \rangle$ -aksen simulert på bakgrunn av tensor #5 og #6 plottet sammen med det beste EIE-spekteret fra en deutrert krystall for radikal LIII. Bredden til spektrene passer godt med hverandre. Det simulerte spekteret viser hvordan den store vekselvirkningen som tensor #5 representerer, splittes opp i en dublett forårsaket av tensor #6. Det eksperimentelt målte EIE-spekteret er ikke godt. Deler av spekteret ligger under spekterets grunnlinje, og ser ut til å være invertert. Disse to stedene dette skjer, passer imidlertid godt med plasseringen til to av de simulerte absorpsjonslinjene.

De gode overenstemmelsene mellom målte og simulerte spektre, både for vanlig og deutrert krystall, tyder på at tensorene etablert for LIII er gode representasjoner for radikalet.



Figur 4-34: Sammenligning av EIE-spektre fra eksperimentelle opptak (svart linje) for en vanlig krystall og simulerte EPR-absorpsjonsspektre (rød linje) for $\langle a \rangle$ -aksen og $\langle c \rangle$ -aksen rettet parallelt med magnetfeltet. De simulerte spektrene er basert på de fire tensorene #3, #5, #6 og #7 etablert ut fra eksperimentelle data. Mikrobølgefrequensene er 9.770 GHz for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$ og 9.780 GHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$. De eksperimentelle EIE-spektrene er tatt opp ved ENDOR-frekvensen låst ved henholdsvis 59.82 MHz for $\vec{B} \parallel \langle a \rangle$ (tilsvarer kobling #3) og 32.26 MHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$ (tilsvarer kobling #7).

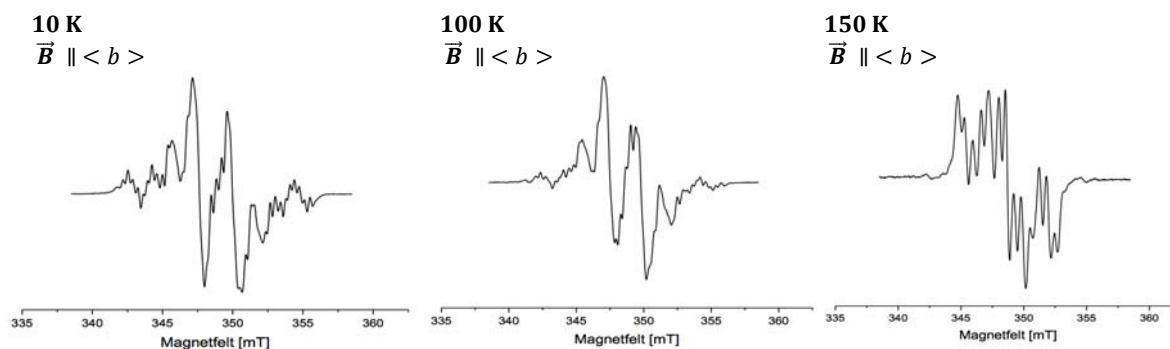


Figur 4-35: Sammenligning av EIE-spekteret fra eksperimentelt opptak (svart linje) i en deuteret krystall og simulert EPR-absorpsjonsspekter på bakgrunn av tensor #5 og #6 (rød linje) for magnetfeltet rettet parallelt med $\langle c \rangle$ -aksen. Mikrobølgefrequensen per 9.752 GHz. Det eksperimentelle EIE-spektret er tatt opp med ENDOR-frekvensen låst ved 33.40 MHz (tilsvare kobling #6).

4.4 Resultater ved høyere temperaturer

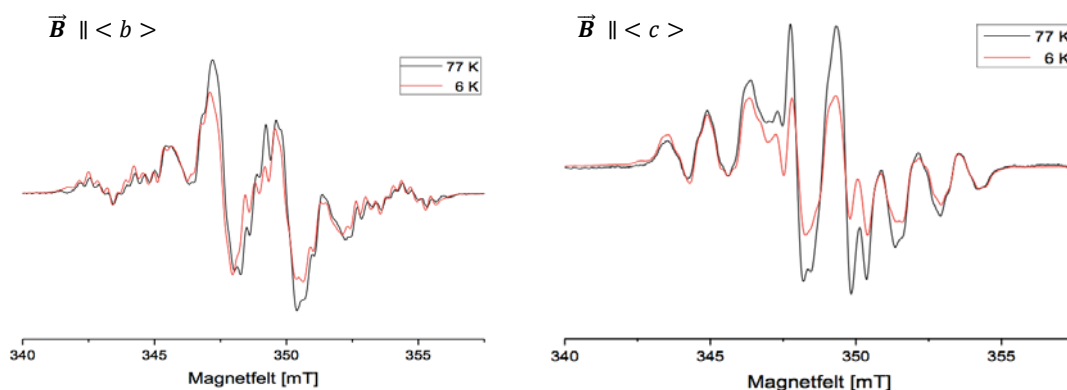
På slutten av et EMR-eksperiment med en vanlig krystall bestrålt ved 6 K ble det gjort EPR-opptak ved forskjellige temperaturer høyere enn 6 K. Temperaturen ble økt kontrollert ved at tilførselen av flytende helium ble redusert og ved innstillinger av et termostatkontrollert varmeelementet. Ved ønskede målepunkter ble temperaturen holdt uendret i ca. 10 min slik at eventuelle endringer stabiliserte seg, før det ble utført et EPR-opptak. Figur 4-36 viser EPR-spektre, hvor magnetfeltet er rettet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen, tatt opp ved temperaturer på 10 K, 100 K og 150 K. Disse tre spektrene viser at forandringene, både når det gjelder bredde og hyperfinsplittings, er mer omfattende ved temperaturer høyere enn 100 K. EPR-spektrene ved 10 K og 100 K er forholdsvis like, selv om det har skjedd noen mindre endringer. EPR-spektret ved 150 K viser imidlertid en signifikant forandring i forhold til de to andre, både i hyperfinsplittings og relative intensiteter. Det kan dermed tyde på at lavtemperaturreadikaler eksisterer frem til en temperatur på omkring 100 K, mens ved høyere temperaturer vil ett eller flere henfalle og danne sekundære radikaler.

I tillegg til eksperimentene med flytende helium ble det utført noen få eksperimenter etter bestråling ved 77 K gjort ved å kjøle krystallen med flytende nitrogen. Figur 4-37 viser sammenligning av EPR-spektre fra vanlige krystaller bestrålt og gjort opptak ved 6 K og 77 K ved $\langle b \rangle$ - og $\langle c \rangle$ -aksene, og figur 4-38 viser tilsvarende spektre for deuteret krystall med samme temperaturer. Alle disse plottene viser at opptakene ved 6 K og 77 K samsvarer godt når det gjelder både bredden av spektret og hyperfinoppsplittings, selv om det er noen

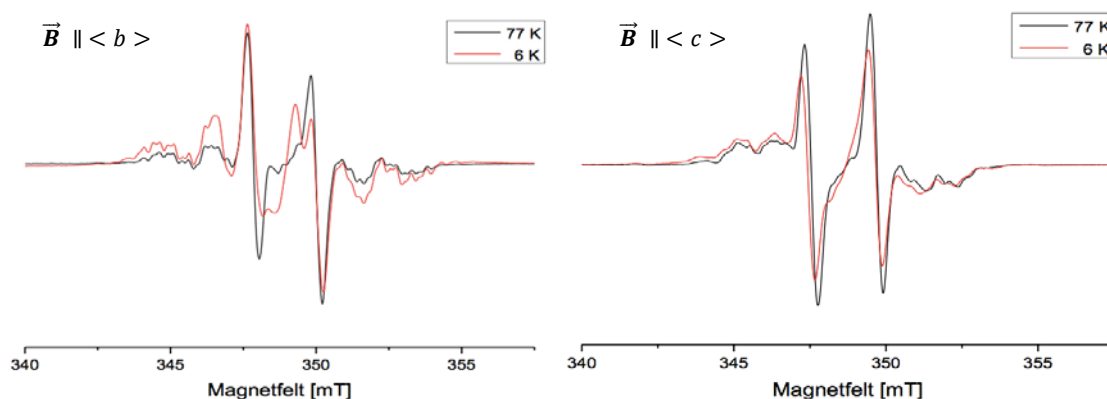


Figur 4-36: EPR-spektre av en vanlig L-asparaginkrystall bestrålt ved 6 K og målt ved 10, 100 og 150 K, tatt med magnetfeltet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen. Mikrobølgefrequenser på 9.767 GHz og attenuert med 46 dB for 10 K, 9.762 GHz og attenuert med 30 dB for 100 K og 9.762 GHz og attenuert med 26 dB ved 150 K.

mindre variasjoner. Disse figurene støtter derfor antagelsen om at det må en temperatur på over 100 K til for at nok termisk energi skal være tilstede for å drive videre prosesser.

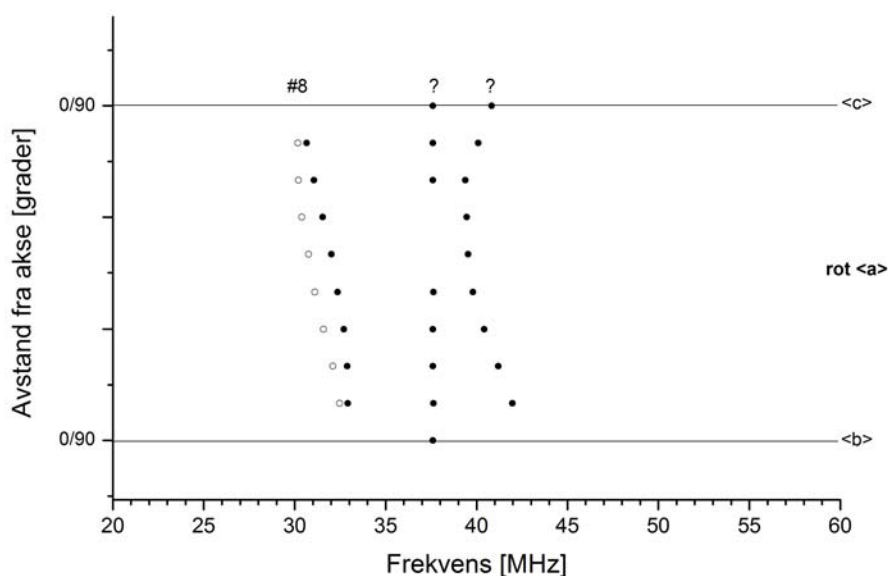


Figur 4-37: EPR-spektre av vanlige L-asparaginkrystaller tatt opp ved 77 K (svart linje) og 6 K (rød linje). Figuren til venstre viser spektrene ved magnetfeltet rettet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen, mens figuren til høyre når magnetfeltet er rettet langs $\langle c \rangle$ -aksen. Mikrobølgefrequenser på 9.771 GHz for 77 K og 9.767 GHz for 6 K ved $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$, og 9.780 GHz for 77 K og 9.767 GHz for 6 K ved $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$.

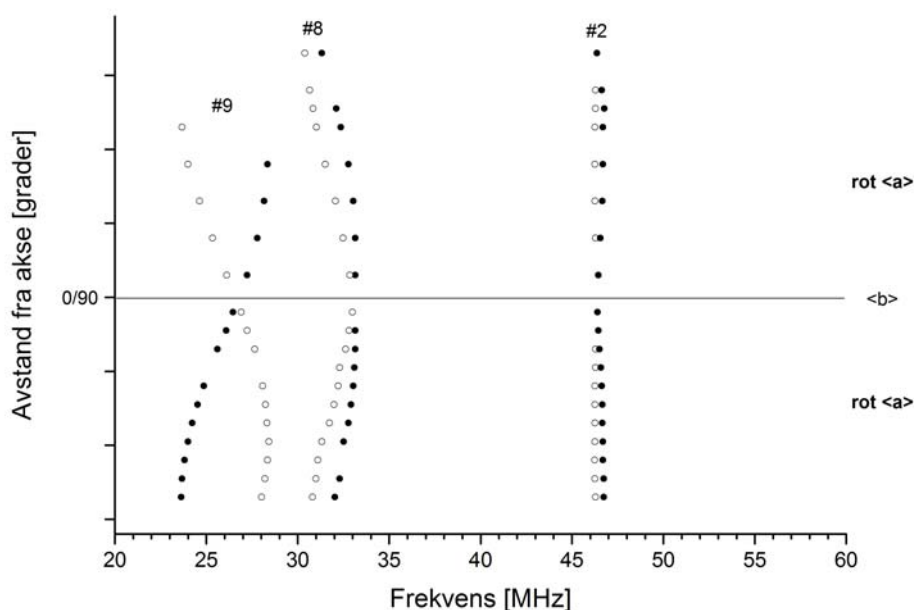


Figur 4-38: EPR-spektre av deutererte L-asparaginkrystaller tatt opp ved 77 K (svart linje) og 6 K (rød linje). Figuren til venstre viser spektrene ved magnetfeltet rettet parallelt med $\langle b \rangle$ -aksen, mens figuren til høyre når magnetfeltet er rettet langs $\langle c \rangle$ -aksen. Mikrobølgefrequenser er normert til 9.770 GHz for $\vec{B} \parallel \langle b \rangle$ og 9.763 GHz for $\vec{B} \parallel \langle c \rangle$.

Figur 4-39 og figur 4-40 viser ENDOR-resonanslinjeposisjoner ved 77 K plottet som en funksjon av rotasjonsvinkel om $\langle a \rangle$ -aksen for en vanlig og en deuterert krystall. ENDOR-spektrene fra disse eksperimentene inneholder en del støy, men i figurene er det vist de få resonanslinjene som det lyktes å følge ved flere orienteringer. I eksperimentet med den vanlig krystallen ble kobling #8 observert, sammen med to ukjente koblinger. I eksperimentet med deuterert krystall ble kobling #2, #8 og #9 (lavfrekventgrenen til kobling #1) observert. Mye tyder på at det er disse koblingene; de har både samme plassering og anisotropi som koblingene analysert ved helium-eksperimentene.

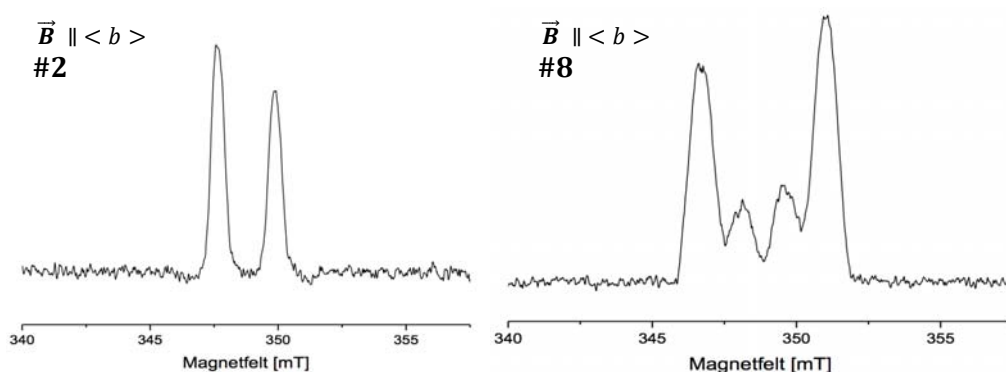


Figur 4-39: ENDOR-resonanslinjeposisjoner som en funksjon av avstand fra aksene for rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen for en vanlig L-asparaginkrystall ved en temperatur på 77 K.



Figur 4-40: ENDOR-resonanslinjeposisjoner som en funksjon av avstand fra aksene for rotasjon om $\langle a \rangle$ -aksen for en deuterert L-asparaginkrystall ved en temperatur på 77 K.

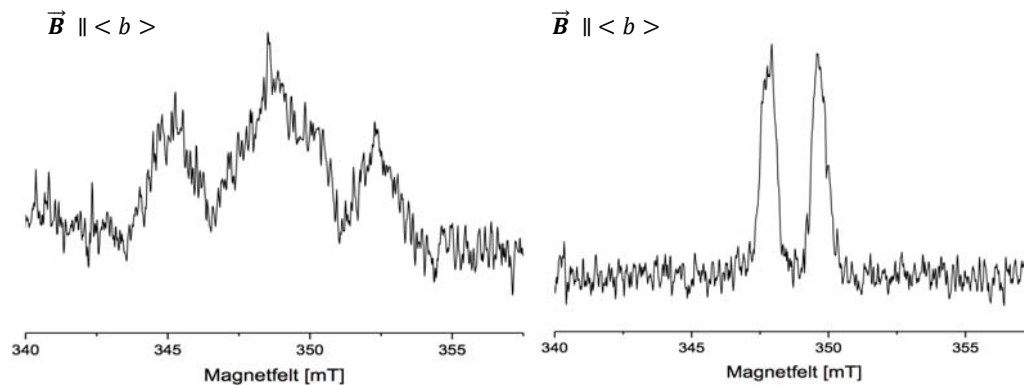
Det ble foretatt opptak av EIE-spektre i eksperimentet med deuterert krystall som støtter antagelsen om at disse koblingene samsvarer med de respektive koblingene observert ved 6 K-eksperimentene. Plottet til venstre i figur 4-41 viser EIE-spektret fra en deuterert krystall tatt ved en resonanslinje som antas å skyldes kobling #2. Dette EIE-spekteret er likt tidligere presentert EIE-spekter for LII tatt opp ved kobling #2 i en deuterert krystall (figur 4.15 kapittel 4.1.5). Bredden av dette EIE-spekteret ved 77 K og 6 K er begge målt til å være omkring 2.5 mT, og begge spektrene består av en dublett. Plottet til høyre i samme figur er tatt ved ENDOR-frekvensen låst til en resonanslinje som antas å skyldes kobling #8 i et deuterert eksperiment. Dette er også likt deuterert EIE-spekter for LI tatt opp ved tidligere eksperimenter (figur 4-11 kapittel 4.1.4). Både bredden av spekteret på omkring 5 mT og oppsplittingen i fire linjer, kan observeres i dette spekteret både ved 77 K og 6 K. Det kan dermed se ut til at både radikal LI (kobling #1 og kobling #8) og radikal LII (kobling #2) er tilstede ved 77 K.



Figur 4-41: EIE-spektre tatt opp i en deutertr krystall ved 77 K. Spektret til venstre skyldes kobling #2 (radikal LII) og er tatt opp ved en ENDOR-frekvens på 46.30 MHz, og spektret til høyre tilhører kobling #8 (radikal LI) og er tatt opp ved en frekvens på 32.91 MHz. Begge spektrene er tatt opp med krystallens $\langle b \rangle$ -akse rettet langs magnetfeltet. Mikrobølgefrekvensene er 9.766 GHz.

At det verken observeres linjer eller tydelige EIE-spektre fra LIII betyr ikke at radikalet ikke er tilstede; mye støy i de eksperimentelle data førte til at det var vanskelig å følge resonanslinjer gjennom rotasjonsplanet, men likheten i EPR-spektrene mellom 6 K og 77 K er stor (se figur 4-37 og 4-38). I tillegg ble det observert et EIE-spekter ved en frekvens på 26.77 MHz som kan ligne noe på EIE-spektre tatt fra radikal LIII i en deutertr krystall (figur 4-20 kapittel 4.1.6), se plottet til venstre i figur 4-42. Frekvensen som dette EIE-spekteret er tatt ved kan tilsvare lavfrekventgrenen til kobling #6. I heliumeksperimentet med deutertr krystall lyktes det kun å ta opp et middels godt EIE-spekter ved $\langle c \rangle$ -aksen, dette har en bredde på omlag 6 mT. Spekteret til venstre i figur 4-42 er noe bredere enn dette, ca. 7.5 mT, men er tatt ved $\langle b \rangle$ -aksen hvor bredde-bidraget fra tensor #6 (α -koblingen) er mye større (se figur 4-1 kapittel 4.1.1 og 4-18 kapittel 4.1.6).

De to linjene i figur 4-39 som ikke ble identifisert kan skyldes koblingene til LI og LII som kun ble funnet ved DFT-beregninger, radikaler som ikke ble oppdaget ved heliumstudiene eller nye radikaler som er dannet ved temperaturer opp mot 77 K. Ut fra posisjonene i ENDOR-spekteret ser det likevel ikke ut til at de passer med de vekselvirkningene i radikal LI og LII som ikke ble observert eksperimentelt men kun oppdaget ved DFT-beregningene. Det kan også se ut til at det er nye radikaler som ikke tidligere er blitt oppdaget til stede ut fra EIE-spekteret plottet til høyre i figur 4-42. Dette EIE-spekteret er tatt ved en ENDOR-frekvens på 41.60 MHz i en deutertr krystall og viser en mindre dublett (bredde på omtrent 2 mT) enn den som observeres for radikal LII. Dette EIE-spekteret er ikke observert tidligere.



Figur 4-42: EIE-spektre tatt opp med $\langle b \rangle$ -aksen parallell med magnetfeltet i en deuteret L-asparaginkrystall ved 77 K. Spekteret til venstre skyldes mest trolig radikal LIII og er tatt opp ved en ENDOR-frekvens på 26.77 MHz, som kan tilsvare lavfrekventgrenen til kobling #6. Spekteret til høyre er ikke observert tidligere og er tatt opp ved en frekvens på 41.60 MHz. Mikrobølgefrequensene er 9.765 GHz i plottet til venstre og 9.767 GHz i plottet til høyre.

5 Diskusjon

Det er i det foreliggende EPR/ENDOR/EIE-studiet ble det gjort observasjoner knyttet til tre lavtemperaturreadikaler. Et protonert amid-anion (LI), et protonert karboksyl-anion (LII) og et dekarboksyleringsradikal (LIII). I det følgende kapitlet vil det foretas en diskusjon av dette studiets resultater i lys av tidligere utførte arbeider på aminosyren L-asparagin og det vil gis forslag til dannelsesmekanismer samt forslag til videre reaksjonsgang for de tre radikalene.

5.1 Tidligere arbeid på L-asparagin

I en EPR analyse fra 1970 av flere aminosyrer i alkalisk glass utført av Sevilla [16], ble det for L-asparagin ved 77 K gjort observasjoner som han knyttet til et mulig anion i amidgruppen til L-asparagin, likt som radikal LI. Grunnen for denne antagelsen var et EPR-spekter med en stor dublett-oppsplitting på om lag 2.5 mT. Dette er ikke i samsvar med det foreliggende arbeidets data for LI, av den grunn av at oppsplitting av bare tensor #1 (en av fire betydelige vekselvirkninger for LI) alene er større enn denne dublett-oppsplittingen på 2.5. Derimot samsvarer størrelsen på hfvv-en til det foreliggende arbeidets kobling #2 samt radikal LII sitt EIE-spekter (se kapittel 4.1.5) overens med observasjoner Sevilla gjør. Det er derfor trolig at det er nettopp karboksyl-anionet Sevilla observerte ved 77 K.

Innledningsvis ble det nevnt at det spesielt er de tre aminosyrene L-lysin, L-arginin og L-asparagin som er blant de viktigste kontaktpunktene for vekselvirkninger mellom histonene og DNA. Zhou og Nelson har i de senere årene foretatt analyser av radikaldannelse i L-lysin og L-arginin. I deres arbeid fra 2010 på én-krystaller av L-arginin·HCl ved 66 K [60] ble det bl.a. identifisert både et karboksyl sentrert radikal og et dekarboksyleringsradikal, samt et mulig reduksjonsradikal i sidekjeden av molekylet. Samme året publiserte de også et tilsvarende studie av én-krystaller av L-lysin·HCl ved 66 K [61]. Her ble det observert tre radikaler, hvor de to identifiserte var et karboksylanion og et dekarboksyleringsprodukt. Både i L-lysin og i L-arginin ble altså de samme radikalene som dette studiets LII (protonert karboksyl-anion) og LIII (dekarboksyleringsradikalet) identifisert. Arbeidene til Zhou og Nelson sammen med annet arbeid, som for eksempel Sagstuen m.fl. sitt arbeid på aminosyrene L- α -alanin og α -glysin [9], bekrefter at disse to produktene er vanlige primærradikaler hos aminosyrer. I tillegg er det av Strzelczak m.fl. blitt målt dannelses av CO₂-gass i bestrålte prøver av L-asparagin [62], noe som støtter konklusjonen om dannelses av et dekarboksyleringsprodukt. I Strzelczak's studie ble det etablert tre radikaler, men da

datagrunnlag for deres argumenter i denne sammenhengen er mangelfullt, velges det å ikke å kommentere disse ytterligere her.

John M. Coleman's doktorgrad fra 1985 [19] gikk ut på å studere én-krystaller av L-asparagin monohydrat fra en temperatur på 4.2 K og opp til romtemperatur. Resultatene fra 77 K ble publisert av Moulton og Coleman [18]. De identifiserte tre radikaler ved 77 K som Coleman argumenterte for også var tilstede ved 4.2 K. Det ble konkludert med at disse tre radikalene var et protonert karboksylanion, et protonert amid-anion, og et dekarboksyleringsprodukt. I tillegg observerte Coleman ved 4.2 K en kobling som ikke ble identifisert. Coleman bestrålte krystallene til en dose på flere Mrad, hvor $1 \text{ Mrad} = 10 \text{ kGy}$. Coleman's tensorer for de tre radikalene er langt ved i appendiks E. Coleman's studier resulterte altså i akkurat de samme radikalprodukter som det foreliggende arbeidet gjør. Likevel viser en detaljert gjennomgang av de to arbeidene på samme system, at analysen er svært ulik. Det er konkludert forskjellig med hensyn på hvilke hfvv-tensorer som er assosiert til de ulike radikalene, og også når det gjelder hvilke protoner de ulike tensorene representerer spinnvekselvirkninger med. En nærmere studie av Coleman's arbeid viser at en del tensor-data ikke passer overens med de krystallografiske retningene de er antatt å representere, og det er heller ikke oppgitt noe vinkelavvik mellom retningene. Tabell 5-1 viser en oversikt over antagelser rundt observerte koblinger gjort i Coleman's arbeid [19] sammenlignet med analysene rundt de samme koblingene gjort i det foreliggende arbeidet. Med tanke på at moderne EMR har høyere sensitivitet og at det er valgt å ta i bruk EIE i dette studiet, i tillegg til at videre analyse ved avansert molekylstrukturmodellering er blitt tilgjengelig, vil det derfor her argumenteres for at den foreliggende arbeidets resultater er korrekte.

Tabell 5-1: Resultater fra Coleman's arbeid fra 1985 på L-asparagin [19] sammenlignet med resultater fra denne oppgavens delvis tilsvarende arbeid. Her er hver tensor som Coleman etablerte sammenlignet med tolkningen av de samme koblingene gjort i det foreliggende arbeidet. Hver linje omhandler en og samme tensor.

Coleman, 1985				Det foreliggende arbeidet, 2014			
Tensor	Radikal	Temp. [K]	Krystall- retning	Radikal	Tensor	Temp. [K]	Krystall- retning
$\beta_I - H8$	I: karboksyl-anion	77	C1...H8	LIII: dekarboksylering	#5	6	C2...H10
$\beta_{II} - H9$	II: dekarboksylering	77	C2...H9	Ikke observert			
$\beta_{II} - H10$	II: dekarboksylering	4.2 og 77	C2...H10	LI: amid-anion	#1	6	C4...H9
α_{II}	II: dekarboksylering	4.2 og 77	C2-H8	LIII: dekarboksylering	#6	6	C2-H8
$\beta_{III} - H9$	III: amid-anion	77	C4...H9	Ikke observert			
$\beta_{III} - H10$	III: amid-anion	4.2 og 77	C4...H10	LI: amid-anion	#8	6 og 77	C4...H10
4.2-1	Uidentifisert	4.2	Ukjent	LII: karboksyl-anion	#2	6 og 77	C1...H8

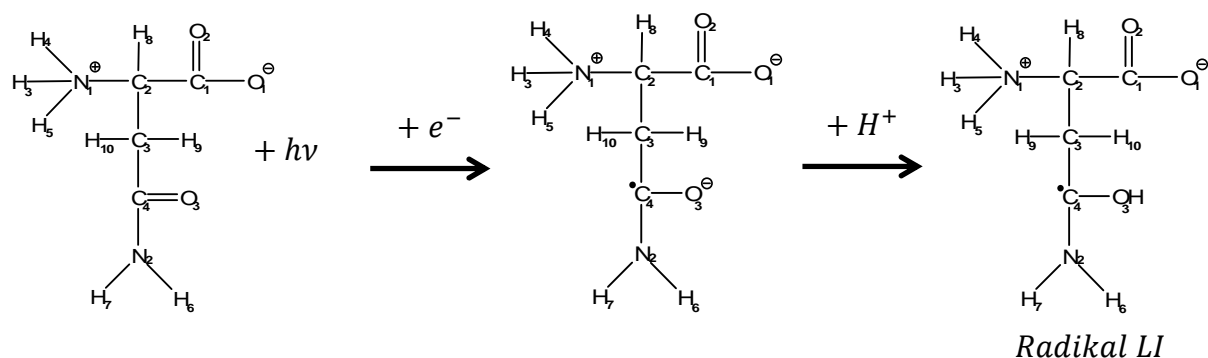
5.2 Protonert amid-anion

5.2.1 LI

De to eksperimentelt observerte koblingene knyttet til amid-anionet, #1 og #8 (se tabell 4-2 kapittel 4.1.4), viste vekselvirkningene mellom spinnet lokalisert til C4 og de ikke-utbyttbare protonene H9 og H10. Avvikene mellom relevante prinsipalretninger og de krystallografiske retningene H9...C4 og H10...C4 hentet fra et intakt L-asparaginmolekyl, var på henholdsvis 9.4° og 15.4°. Dette forholdvis lille avviket indikerte at det var nettopp denne lokaliseringen av spinn og disse protonvekselvirkningene tensorene representerte. De to observerte koblingene dekket ikke hele EIE-spekterbredden i spektre tatt opp ved eksperimenter med vanlige krystaller, men derimot gjorde de det for EIE-spektre tatt opp ved eksperimentet med en deutreret krystall. DFT-beregningene for radikal LI ga to ekstra hfvv-tensorer av betydelige størrelser som skyldes koblinger til utbyttbare protoner (se tabell 4-16 kapittel 4.2.1). Tensorene karakteriserte vekselvirkningen mellom spinnet på C4 og det nitrogenbundne H6 samt det protonet bundet til O3 (H5') som ble overført fra nabomolekylets aminogruppe gjennom intermolekylær hydrogenbinding. DFT-beregningene ga vekselvirkningen med H6 en isotropverdi lik 22.3 MHz, og dens totale hfvv vil ligge omkring dette. Det betyr at denne koblingen i ENDOR-spekteret stort sett sentreres rundt fri-proton-frekvensen, og dermed i det området der koblinger ikke er analysert eksperimentelt i denne oppgaven.

Vekselvirkningen med H5' ble ikke observert eksperimentelt, trolig grunnet ugunstige relaksasjonsforhold. Avviket mellom egenvektorene til maksimal prinsipalverdi for de eksperimentelle og de modellerte tensorene til vekselvirkningene med H9 og H10, var på henholdsvis 2.9° og 0.2° og DFT-beregningene ga en spinntetthet på C4 lik 0.71, noe som er nær spinntettheten beregnet ut fra eksperimentelle data, 0.67. Denne gode overenstemmelsen mellom modellerte og eksperimentelle data støttet derfor i stor grad de eksperimentelle resultatene. Sammenligning av eksperimentelle EIE-opptak og EPR-absorpsjonsspektre simulert ut fra tensor #1 og #8 samt de to teoretiske hfvv-tensorene funnet ved DFT, underbygget også at de eksperimentelt etablerte tensorene representerer de faktiske vekselvirkningene godt.

Figur 5-1 viser foreslått dannelselse og struktur av radikal LI. Foreslått dannelselse av dette primærradikalet, er at karbonylgruppen ved en reduksjonsprosess tar til seg et elektron og molekylet blir dermed negativt ladd. Dette fører til at dobbeltbindingen mellom de sp^2 hybridiserte C4 og O3 går over til å bli en enkelbinding, spinnet lokaliseres på C4 og den negative overskuddsladningen på O3 fører til at et proton trekkes mot og adderes til karbonylgruppen. Resultatene fra DFT-beregningene indikerer at dette protonet (hydrogenkjernen) kommer fra nabomolekylet som O3 inngår i en hydrogenbinding med (H5', som er ett av aminoprotonene på nabomolekylet), men kan også komme fra omgivelsene generelt.



Figur 5-1: Foreslått dannelselse og struktur for radikal LI, protonert amid-anion, som er observert ved 6 K. Anionet dannes ved en reduksjonsprosess og karbonylgruppen protoneres fra et nabomolekyl. Spinnet er lokalisert til C4, og de to observerte β -koblingene #1 og #8 viser dette spinnets vekselvirkning med de ikke-utbyttbare protonene H9 og H10.

5.2.2 Coleman's radikal III

Til det protonerte amid-anionet (kalt radikal III i Coleman's arbeid og LI i det foreliggende arbeidet) knyttet Coleman to β -koblinger. $\beta_{III} - H10$ er nær identisk med dette studiets kobling #8 knyttet til samme radikalprodukt, så antagelsen om at denne koblingens hfvv-tensor viser vekselvirkningen mellom spinnnet på C4 og H10 bekreftes. Den andre β -koblingen, kalt $\beta_{III} - H9$, er ikke observert i det foreliggende arbeidet, men representerer uansett ikke vekselvirkning til H9 slik som Coleman antok. Grunnen til dette er at både resonanslinjens posisjon i ENDOR-spekteret og koblingens hfvv-tensor er helt ulik dette studiets kobling #1 som faktisk representerer denne vekselvirkningen. Det ble testet ut om tensoren $\beta_{III} - H9$ kunne representere andre β -koblinger som ikke ble observert eksperimentelt i dette studiet. Det eneste den kan ha noe til felles med er vekselvirkningen med det overførte protonet (H5') funnet ved DFT-beregninger av radikal LI, amid-anionet. Forskjellen mellom prinsipalverdier og retninger er likevel så stor at det er lite sannsynlig at det faktisk er denne vekselvirkningen tensoren representerer. Denne koblingens resonanslinjer i ENDOR-spekteret passer heller ikke med noen av de få ekstra linjene funnet ved 77 K-studiet gjort i det foreliggende arbeidet.

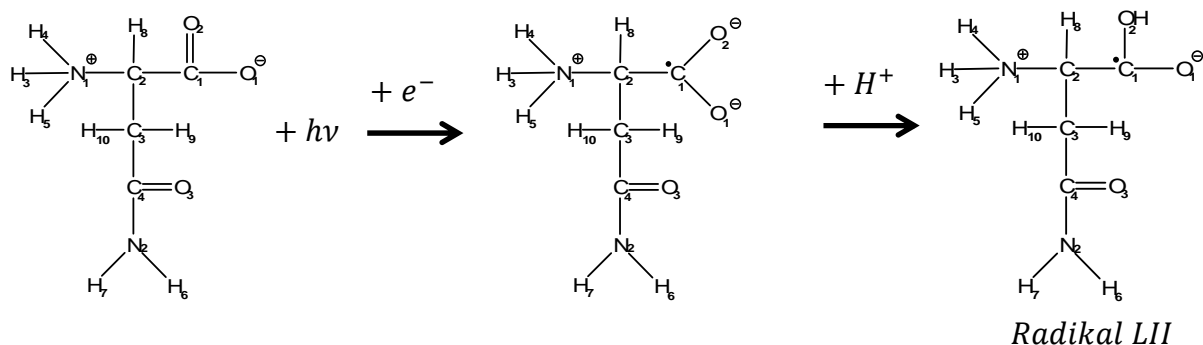
5.3 Protonert karboksyl-anion

5.3.1 LII

Kun en β -kobling ble eksperimentelt observert for dette radikalet, som er foreslått å være et protonert karboksyl-anion. Denne koblingens tensor #2 (se tabell 4-6 kapittel 4.1.5) representerer vekselvirkningen mellom spinnnet lokalisert til C1 i karboksylgruppen og det ikke-utbyttbare protonet H8. Avviket mellom retningen til maksimal prinsipalverdi og den krystallografiske retningen $H8 \cdots C1$ i et uskadd L-asparaginmolekyl er på kun 2.9° . Dette minimale avviket indikerte i stor grad at kobling #2 skyldes vekselvirkning mellom spinnnet lokalisert til C1 og dets β -proton H8. Idet spinnnet kun har én betydelig vekselvirkning, var radikalets EIE-spekter det smaleste av de tre observerte EIE-spektrene, og viste en stor og tydelig dublett. Med magnetfeltet orientert langs $\langle c \rangle$ -aksen i en vanlig L-asparaginkrystall ble det observert en liten ekstra oppsplitting av dubletten. Denne lille vekselvirkningen ble ikke observert i ENDOR-spektrene. Ved DFT-beregningene ble det imidlertid funnet en hfvv-tensor som representerte spinnets vekselvirkning med det utbyttbare aminoprotonet H4'

(de tabell 4-17 kapittel 4.2.2), overført fra nabomolekylet til karboksyloksygen O2 gjennom en intermolekylær hydrogenbinding. Denne tensoren er en forholdsvis svak β -kobling med maksimal hfvv på ca. 28 MHz og forholdsvis stor anisotropi. Koblingens tilhørende ENDOR-linje er dermed stort sett i området der ENDOR ikke er analysert eksperimentelt, noe som trolig var grunnen til at den respektive ENDOR-linjen ikke ble kartlagt i våre eksperimenter. DFT-beregningene ga et spinn på C1 lik 0.73 og et godt samsvar mellom maksimal prinsipalretning for eksperimentell og modellert hfvv-tensor for vekselvirkningen med H8. Avviket mellom de to retningene var på kun 1.5°. EPR-absorpsjonsspektre ble simulert på bakgrunn av den eksperimentelle tensoren #2 og tensoren til det overførte protonet funnet ved DFT-beregninger. Simuleringene ga en ekstra oppsplitting av dubletten kun når $\langle c \rangle$ -aksen var rettet parallelt med magnetfeltet, i likhet med eksperimentelle EIE-spektre. Samsvaret mellom de karakteristiske prinsipalretningene for koblingene, krystallretninger og teoretiske resultater ga antagelsene rundt strukturen til LII høy troverdighet.

Figur 5-2 viser foreslått dannelses og struktur av radikal LII. Dannelsen av radikal LII foreslås å være en reduksjonsprosess ved at karboksylgruppen i et uskadd L-asparaginmolekyl tar til seg et løsevev elektron, molekylet blir et anion med spinn lokalisert til C1 og får en negativ overskuddsladning. Den negative tilleggsladningen fører til at et proton fra et nabomolekyl trekkes over og adderes til et av oksygenene i karboksylgruppen (DFT-beregningene ga best resultat ved at O2 protoneres av nabomolekylets H4') eller fra omgivelsene rundt, og radikalet gjenoppretter molekylets opprinnelige ladningstilstand.



Figur 5-2: Foreslått dannelses og struktur for radikal LII, protonert karboksyl-anion som er observert ved 6 K. Anionet dannes ved en reduksjonsprosess og karboksylgruppen protoneres. Spinnets sitter på C1, og den observerte β -koblingen #2 representerer dette spinnets vekselvirkning med det ikke-utbyttbare protonet H8.

5.3.2 Coleman's radikal I

Coleman etablerte for sitt karboksyl-anion (kalt radikal I i Coleman's arbeid og LII i det foreliggende arbeidet) en β -tensor, $\beta_I - H8$, som ble antatt å representere en vekselvirkning med β -protonet H8 for radikalet med spinnet lokalisert til C1. Denne resonanslinjens posisjon i ENDOR-spekteret samt dens tilhørende hfvv-tensor viser at dette er den samme som kobling #5 observert i det foreliggende arbeidet. Kobling #5 er vist, ved bl.a. EIE, å tilhøre dekarboksyleringsproduktet, og tensorens maksimalverdi har et avvik på 2.6° med C2...H10 retningen. Som nevnt tidligere, ble det i dette studiet utført et ekstra eksperiment for å finne høyfrekventgrenen av kobling #5, da det først feilaktig ble antatt at den observerte resonanslinjen var koblingens høyfrekventgren. Våre første analyser ble gjort basert på denne feilantagelsen. Tabell 5-2 viser at Coleman's $\beta_I - H8$ -tensor er nær identisk med tensoren funnet for kobling #5 ved den feilaktige antagelsen at det var høyfrekventgrenen til koblingen som ble analysert. Det ser dermed ut til at også Coleman antok at resonanslinjene målt for koblingen var høyfrekventgrenen, noe som i dette studiet ble avslørt som feil ved hjelp av EIE-spektre. Egenvektorene for prinspalverdiene i tabell 5-2 er nær identiske. Tabell 5-3 viser at ved å ta Coleman's $\beta_I - H8$ -tensor og addere fire ganger fri-proton-frekvensen til prinspalverdiene¹⁴, oppnås en nær identisk tensor med dette studiets tensor #5 etablert ut fra at den analyserte resonanslinjen representerer lavfrekventgrenen til koblingen. Prinspalverdienes egenvektorer er uendret og er av den grunn ikke gjentatt i tabell 5-3.

Tabell 5-2: Viser Coleman's tensor $\beta_I - H8$ [19] sammen med tensor #5 fra det foreliggende arbeidet dersom det antas at resonanslinje #5 i ENDOR-spekteret representerer høyfrekventgrenen til koblingen.

Tensor	Prinspalverdier [MHz]	Egenvektor		
		<a>		<c>
$\beta_I - H8$	66.83	-.0402	-.4472	.8935
	58.00	-.9214	-.3293	-.2063
	53.80	-.3865	.8316	.3988
Tensor for #5	67.33 (3)	-.0359 (22)	-.4929 (13)	.8693 (35)
analysert som	59.24 (2)	-.9350 (5)	-.2907 (31)	-.2034 (11)
høyfrekventgren	54.53 (2)	-.3529 (3)	.8201 (27)	.4505 (12)

¹⁴ Differansen mellom en tensors prinspalverdier basert på om en gitt ENDOR-linje er analysert som en høyfrekventlinje eller lavfrekventlinje kan vises å være $4\nu_p$ (Atherton [27], ligning 5.2.35).

Tabell 5-3: Viser Coleman's tensor $\beta_I - H8$ [19] hvor det er addert $4v_p$ til hver prinsipalverdi for å estimere prinsipalverdiene en ville ha fått dersom den samme resonanslinjen hadde blitt analysert som en lavfrekventgren av koblingen. v_p i Coleman's deres forsøk er lik 15.35 MHz. Tabellen viser også prinsipalverdiene til tensor #5 fra dette studiet, analysert ut fra at målinger i ENDOR-spekteret representerer lavfrekventgrenen til koblingen.

Tensor	Prinsipalverdier [MHz]
$\beta_I - H8 + 4v_p$	128.23
	119.40
	115.20
Tensor for #5	128.05 (2)
analysert som	119.11 (2)
lavfrekventgren	115.04 (2)

Ved en temperatur på 4.2 K observerte Coleman en kobling, kalt for 4.2-1, som ble antatt å høre til et uidentifisert lavtemperturradikal. Denne koblingens posisjon i ENDOR-spekteret samt dens tensor, er nær identisk med tensor #2 (tabell 4-6 kapittel 4.1.5) i det foreliggende arbeidet, og er det antas derfor at 4.2-1 er tensoren som viser vekselvirkningen til karboksyl-anionets spinn med H8 ved 4.2 K.

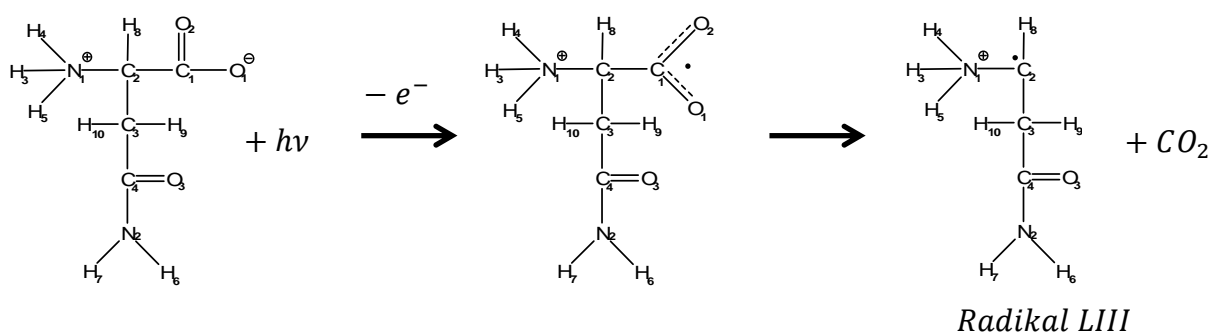
5.4 Dekarboksyleringsprodukt

5.4.1 LIII

Radikal LIII har det bredeste EIE-spekteret og er radikalet som definerer bredden av EPR-spektrene. Med sine tre β -koblinger og sin ene α -kobling (tabell 4-14 kapittel 4.1.6), ble LIII foreslått til å være et dekarboksyleringsprodukt med det uparede elektronet lokalisert til C2. Minimale avvik mellom aktuelle prinsipalretninger og L-asparagins krystallografiske retninger førte til en slutning om at de fire eksperimentelt observerte koblingene #3, #5, #6 og #7 karakteriserer spinnets vekselvirkninger med henholdsvis H5, H10, H8 og H4, hvor de to aminoproteinene H4 og H5 er utbyttbare. De fire koblingene som ble observert eksperimentelt dekker mer eller mindre radikalets EIE-spekterbredde for magnetfeltet rettet langs alle aksene. Det ble heller ikke funnet noen andre hfvv-tensorer av betydelig størrelse ved DFT-beregninger på LIII. Vekselvirkningene med β -protonene H3 og H9 ble ikke observert

eksperimentelt og ble ved DFT-beregningene små, noe som var forventet ut fra at dihedralkvinkel-beregninger under EMR-analysen viste at disse ville ligge nær nodalplanet til spinnorbitalen (se tabell 4-15 kapittel 4.1.6). Resultatene fra DFT-beregningene samsvarte meget godt med alle eksperimentelle data, og spinntettheten på C2 ble beregnet til 0.89. Dette er veldig nær den eksperimentelt beregnede spinntettheten, beregnet ut fra mest positive anisotrope komponent, lik 0.87.

Figur 5-3 viser foreslått dannelses og struktur av radikal LIII. LIII foreslås å være et resultat av en oksidasjonsprosess. Bestrålingen fører til at et elektron spaltes fra L-asparagin og molekylet blir et positivt ladd kation. C1-C2 bindingen svekkes og karboksylgruppen spaltes av, radikalet blir et dekarboksyleringsprodukt med spinnet på C2. Avspaltningen kan skje spontant, med ingen eller liten aktiveringsenergi [63, 64]. Det sp^3 -hybridiserte C2-atomet rehybridiserer til nær sp^2 ved dekarboksyleringen, noe som reflekteres i det relativt store avviket på 19.3° mellom største positive anisotrope retning for α -tensoren og den krystallografiske retningen H8-C2 i et uskadd molekyl. Dette ble også indikert ut fra at det for kobling #5 var en forskjell mellom prinsippalretningenes fortegn som DFT-beregningen ga og fortegnene til den krystallografiske retningen H10...C2 for samme asymmetriske enhet. Ettersom den krystallografiske retningen er gitt for det intakte uskadede L-asparaginmolekylet, tyder det på at det har funnet sted geometriendringer under dannelsen av radikal LIII, noe som også er å kunne forventes da det bl.a. har funnet sted en rehybridisering. Sammenligningen av beregnet verdi for p-orbitalens spinntetthet med McConnell-relasjonen [28] for isotropkomponenten og Bernhard/Gordy-relasjonen [29, 30] for α -koblingens dipolkobling, viser at det trolig er en viss bukling av strukturen ved at C2 ikke er fullstendig rehybridisert fra sp^3 til sp^2 .



Figur 5-3: Foreslått dannelses og struktur for radikal LIII, dekarboksyleringsproduktet, som er observert ved 6 K. Kationet dannes ved oksidasjonsprosess som fører til at karboksylgruppen spaltes av. Spinnet er lokalisert til C2, og eksperimentelt observerte vekselvirkninger er til β -protonene H4 (#7), H5 (#3) og H10 (#5) samt α -protonet H8 (#6).

5.4.2 Coleman's radikal II

Observasjonene knyttet til Coleman's dekarboksyleringsprodukt (kalt radikal II i Coleman's arbeid og LIII i det foreliggende arbeidet) ledet til to β -koblinger og en α -kobling. Hfvt-tensoren til α -koblingen, kalt α_{II} , tilsvarer dette studiets α -tensor #6 og posisjonen av ENDOR-resonanslinjer er samsvarende for de to studiene. Coleman's konklusjon at α_{II} representerte en vekselvirkning mellom spinnet på C2 og α -protonet H8 er derfor bekreftet gjennom det foreliggende arbeidet. Den ene β -tensoren, kalt $\beta_{II} - H10$, ble antatt å skyldes vekselvirkningen med proton H10. $\beta_{II} - H10$ sin posisjon i ENDOR-spekteret samt dens hfvt-tensor er imidlertid nær identisk med dette studiets kobling #1 (se tabell 4-2 kapittel 4.1.4), og viser derfor egentlig en vekselvirkning mellom spinnet på C4 og protonet H9 for det protonerte amid-anionet. Den andre β -koblingen, kalt $\beta_{II} - H9$, ble observert av Coleman ved 77 K, men ikke ved 4.2 K. Coleman's 77 K data viser at denne koblingen er liten og resonanslinjen ligger lavere enn 20 MHz. Den er således ikke forsøkt identifisert og analysert i det foreliggende arbeidet (om den i det hele tatt er tilstede ved 6 K). DFT-beregningene for dette radikalet gir imidlertid ikke noe overbevisende samsvar mellom Coleman's $\beta_{II} - H9$ tensor og C2...H9 tensoren for dekarboksyleringsradikalet (appendiks D, tabell D.4, D.5 og D.6).

5.4.3 Oppsummering, Coleman's arbeid

Coleman gjorde sine radikalanalyser med utgangspunkt i observasjoner gjort ved 77 K og hovedsakelig med delvis deutrerete krystaller. Ved analyse av eksperimentet ved 4.2 K ble det da notert at koblingene $\beta_{II} - H10$ (tilsvarende #1 for LI), $\beta_{III} - H10$ (tilsvarende #8 for LI) og α_{II} (tilsvarende #6 for LIII) ble observert. Ettersom også den store dubletten i EPR-spektrene som var et resultat av radikalet kalt for radikal I ble observert, ble det dermed konkludert med at alle de tre radikalene også eksisterte ved 4.2 K.

Det er hittil gjort rede for at Coleman analyserte koblingene #1, #5, #6 og #8 i sitt 77 K-studie, og kobling #2 i sitt 4.2 K-studie. Coleman har ikke observert noen koblinger til protoner ved 4.2 K som ikke knyttes til et identifisert radikal i det foreliggende arbeidet. Han observerte imidlertid ikke 4.2-l ved 77 K, men det foreliggende arbeidets få data fra 77 K-eksperimentet viste både ut fra plassering av ENDOR-resonanslinjer og utseende til EIE-spekteret at kobling #2, og dermed det protonerte karboksyl-anionet, også var tilstede ved 77 K. I tillegg så kan den store dublettens tilstedeværelse i EPR-spektrene ved 77 K brukes til argumentasjon for at kobling #2 er tilstede, slik Coleman argumenterte for dens eksistens ved

4.2 K. Når det gjelder de to siste koblingene observert i dette studiet, #3 og #7, så er disse de eneste som viser vekselvirkninger med utbyttbare protoner, og er derfor mest sannsynlig ikke observert i Coleman's arbeid av den grunn av at dette i hovedsak baserte seg på analyse av ENDOR-spektre for delvis deutererte krystaller.

Det faktum at $\beta_{III} - H9$ og $\beta_{II} - H9$ verken ble observert under vårt 6 K-studie eller Coleman's 4.2 K-studie kan tyde på at disse ikke tilhører primærradikalene, men heller et produkt som dannes ved temperaturer nærmere 77 K. I tillegg antok Coleman at begge disse viser vekselvirkninger mellom feil spinn og proton. Koblingen $\beta_{III} - H9$ ble antatt å representere den vekselvirkningen som egentlig hans $\beta_{II} - H10$ representerer, og $\beta_{II} - H9$ samsvarer ikke med resultatene fra DFT-beregningene for vekselvirkningen mellom protonet H9 og et spinn lokalisert til C2. Det ble i det foreliggende arbeidet ved 77 K detektert et nytt EIE-spekter som ikke tilhørte verken LI, LII eller LIII. Dette støtter en hypotese om at det har skjedd nye radikaldannelser ved denne temperaturen. I tillegg observerte Coleman ved 77 K fire nye linjer, 77-(-1), 77-0, 77-00 og 77-5, som ikke ble identifisert til spesifikke vekselvirkninger, og hvor han kun fikk etablert tensor for 77-5. Én forklaring på at $\beta_{II} - H9$ og $\beta_{III} - H9$ ikke observeres kan være at geometriforandringer ved en temperaturøkning til 77 K gjør at verdier og retninger for begge to ikke passer inn med det foreliggende arbeidets observasjoner og DFT-studier. Likevel vurderes en slik antagelse som ganske lite sannsynlig ut fra at alle de andre tensorene Coleman etablerte ved 77 K i stor grad samsvarer med observasjoner ved 6 K i det foreliggende arbeidet.

5.5 Observasjoner ved høyere temperaturer

I det foreliggende arbeidet ble det ved 77 K gjort observasjoner knyttet til LI, LII og muligens LIII, og ved oppvarming av en krystall bestrålt ved 6 K ble det ved 150 K observert signifikante endringer i EPR-spektrene. Coleman gjorde også undersøkelser med hensyn på hvilke temperaturer høyere enn 77 K de tre radikalene fremdeles var til stede. I arbeidet sitt har han da oppgitt hvilke koblinger som ble detektert i eksperimenter ved de forskjellige temperaturene. Ettersom de fleste av disse koblingene nå er knyttet opp mot andre vekselvirkninger og andre radikaler, så kan Coleman's resultater benyttes til å finne noe ut av hva som skjer med radikalene LI, LII og LIII når temperaturen øker. Det er i tillegg ut fra EIE-spektrene kjent at karboksyl-anionet er opphav til den store dublett-oppsplittingen og dekarboksyleringsradikalet til bredden av EPR-spektre, dette er parametere som til en viss grad kan indikere disse radikalenes nærvær.

Coleman konkluderte, ut fra observerte koblinger og strukturer i EPR-spektrene, at de tre radikalene var til stede både ved 4.2 K og 77 K, og argumenterte også at EPR-spekterbredden og formen var lik ved de to temperaturene. Egentlig observerte han koblingen tilsvarende kobling #2 kun ved 4.2 K, men kobling #2 er observert i det foreliggende 77 K-studiet. Likheten i EPR-spektrene ved de to temperaturene stemmer overens med observasjonene foretatt ved eksperimentene utført ved 77 K i det foreliggende studiet. Det ser dermed ut til at alle de tre lavtemperaturradikalene LI, LII og LIII også er til stede ved 77 K.

Ved 128 K observerte Coleman alle koblingene fra 77 K, uten om de som tilsvarende kobling #5 og #6 (i tillegg til kobling #2, da han observerte denne kun ved 4.2 K). Kobling #5 og #6 er de to eneste vekselvirkningene Coleman observerte assosiert til LIII (dekarboksyleringsproduktet), som følge av at studiene stort sett baseres på deutrerete krystaller. Da han heller ikke observerte koblingen som tilsvarende kobling #2 (karboksyl-anion) ved 77 K – og dermed heller ikke 128 K – betyr det at det kun var koblinger assosiert til LI (amid-anion) som ble detektert i ENDOR-spektrene. Altså det eneste som sikkert observeres ved 128 K er radikal LI, protonert amid-anion. Selv om Coleman ikke observerte koblingene som tilsvarende #5 og #6, antok han imidlertid at disse fremdeles eksisterte, men at de var for svake til å observeres. Koblingene som tilsvarende #5 og #6 ble i Coleman's arbeid knyttet til karboksyl-anionet (som gir dublett i EPR-spektrene) og dekarboksylering (som gir bredde i EPR-spektrene), og han knyttet også feilaktig andre koblinger som ble observert ved 128 K til sistnevnte radikal. Noe av grunnen til at han antok at koblingene som tilsvarende #5 og #6 fremdeles var tilstede ved 128 K, selv om de ikke ble observert i ENDOR-spekteret, var nok basert på at dubletten og bredden fremdeles var tilstede i EPR-spektrene. Det er derfor ingen sikre holdepunkter for at dekarboksyleringsradikalet og karboksyl-anionet "overlever" denne temperaturen, annet enn strukturer i EPR-spektrene. Coleman rapporterer imidlertid at han observerte ni nye ENDOR-linjer ved en temperatur på 128 K. Disse kan muligens ha innvirkning på både hyperfinstrukturen og bredden i EPR-spektrene.

Fra 146 K til 150 K observerte Coleman store forandringer i spektrene, noe som stemmer med det foreliggende arbeidets observasjoner ved temperaturøkning. Den sterke dubletten i EPR-spektrene forsvant, men bredden i spekteret bestod, og to nye ENDOR-linjer dukket opp. Av den grunn av at dubletten forsvant antok han at protonert karboksyl-anion hadde henfalt, og fordi bredden i EPR-spekteret bestod antok han at dekarboksylering fremdeles var tilstede. De koblingene fra 77 K-studiet som fremdeles ble observert, var koblingene tilsvarende #1 og #8 (selv om disse nå er noe svakere) sammen med de to koblingene $\beta_{II} - H9$ og $\beta_{III} - H9$ (som verken observeres ved det foreliggende arbeidet eller

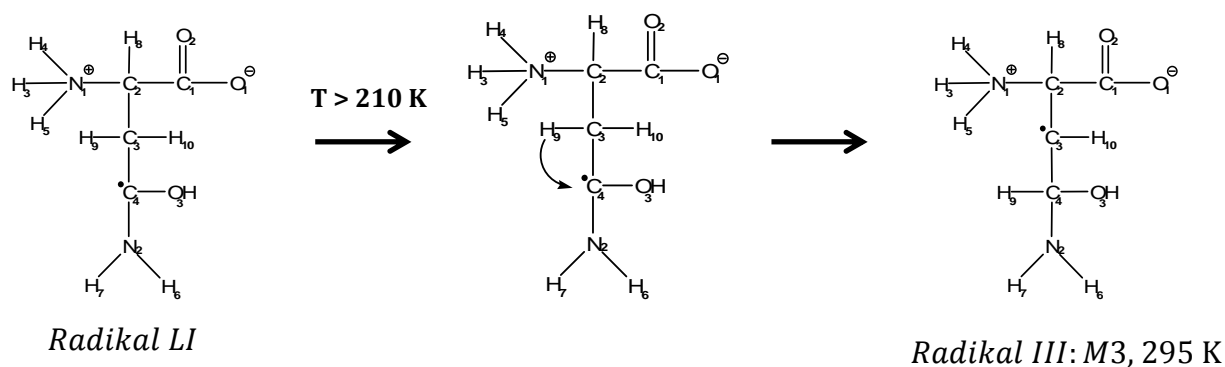
ved Coleman's 4.2 K-studie, og dermed trolig hører til et produkt som dannes ved høyere temperaturer). Kobling #1 og #8 er begge vekselvirkninger knyttet til LI (amid-anion). Det viser igjen at det kun er sikkert at radikal LI fremdeles eksisterer.

Ved 210 K gjør Coleman den samme antagelsen; at dekarboksyleringsproduktet fremdeles eksisterer ut fra bredden i EPR-spektrene. Og han observerer fremdeles koblingene tilsvarende #1 og #8 (LI). Ved romtemperatur observerer han at bredden i EPR-spektrene har avtatt, og konkluderer dermed med at dekarboksyleringsradikalet har henfalt. Han observerer heller ikke lengre koblingene tilsvarende #1 og #8.

5.6 Videre reaksjonsgang ved høyere temperaturer

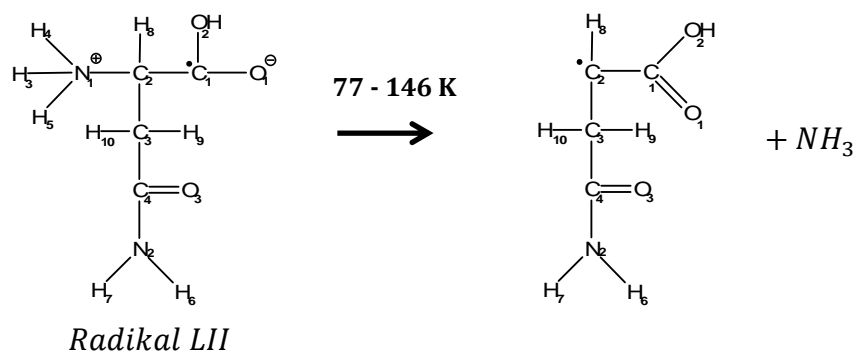
Primærradikaler er ofte reaktive og vil som oftest henfalle til mer stabile sluttprodukter. Det kan se ut til at det protonerte amid-anionet, LI, er det radikalet som henfaller ved høyest temperatur av de tre lavtemperaturreadikalene, i og med at ENDOR-linjer knyttet til dette radikalet ifølge Coleman [19] observeres ved en temperatur på 210 K. Koblinger til de andre to radikaler ble sist observert ved 77 K, men det kan muligens ut fra EPR-spektrienes utseende frem til 146 K for LII (karboksyl-anion) og romtemperatur for LIII (dekarboksyleringsprodukt) argumenteres for at de har henfalt nær disse temperaturene. Knudtsen m.fl. [22] observerte ingen av de tre lavtemperaturreadikalerne LI, LII eller LIII etter bestråling av L-asparagin krystaller ved romtemperatur.

For amid-anionet, LI, konkluderer Coleman med at dette er opphav til et uidentifisert romtemperatur-radikal. I et arbeid på én-krystaller av L-asparagin monohydrat bestrålt og målt ved 295 K viser Knudtsen m.fl. [22] til identifisering av tre stabile radikalprodukter. For det tredje romtemperaturreadikalet er det foreslått en struktur M3 som kan være et sekundærprodukt av nettopp LI. Det ble foreslått at et O3-protonert amid-anion kan være en forløper til M3. En mulig mekanisme for dette er at det forekommer en overføring av H9 mellom C3 og C4 ved temperaturer nær romtemperatur, og at spinnet med dette overføres til C3 i metylen-gruppen, se figur 5-3.



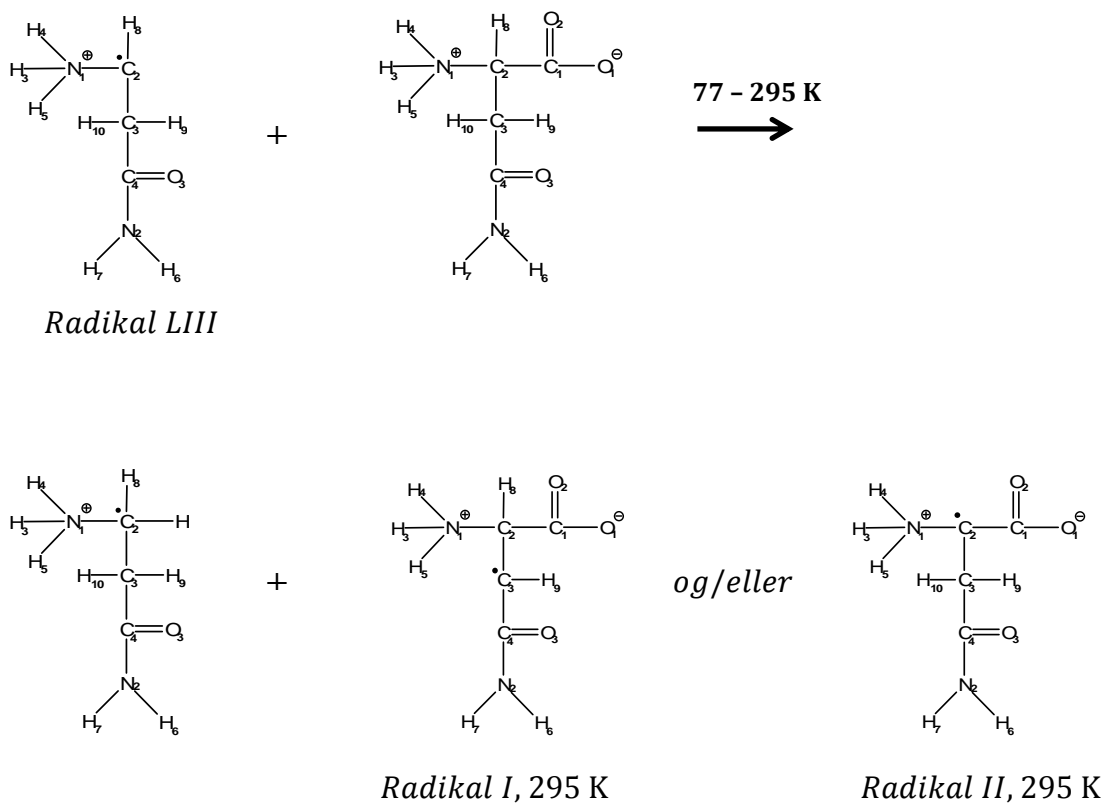
Figur 5-3: Forslag til reaksjonsvei fra primærradikalet LI som dannes ved 6 K og er et protonert amid-anion, til romtemperaturprodukt. Romtemperaturproduktet Radikal III modell M3 er den mest sannsynlige modellen for det tredje radikalet observert ved romtemperatur av Knudtsen m.fl. [22]. I henhold til Coleman [19] observeres radikal LI frem til temperaturen 210 K.

For karboksyl-anionet (LII) er ENDOR-linjer sist observert ved 77 K, men dens karakteriske dublett forsvinner ikke fra EPR-spektrene før ved 146 K. Når det gjelder LII, er det vanskelig å si noe om den videre reaksjonsgangen ut i fra Knudtsen m.fl. sine resultater fra romtemperaturstudier. Figur 1-1 i kapittel 1.2 viser at det er vanlig i aminosyrer at et protonert anion henfaller til et deamineringsprodukt [9]. Coleman hevder at han ved romtemperatur gjør noen observasjoner som kan knyttes til et deamineringsradikal [19], og i Knudtsens sin masteroppgave fra 2008 [21] er det gjort observasjoner (linje navngitt #9 i Knudtsens masteroppgave) som knyttes til et uidentifisert radikal, men som kan være et deamineringsprodukt. Dette kan dermed være en mulig reaksjonsgang for radikal LII, og er skissert i figur 5-4. I Sevilla sitt arbeid [16], hvor det ut fra sammenligning med observasjoner i det foreliggende arbeidet kan se ut til å være detektert et karboksyl-anion, er det ved oppvarming opp til 190 K observert at EPR-spekteret med den store dubletten endres. Det nye EPR-spekteret har karakteristikk som ligner et spekter med en α -kobling, og kan dermed illustrere LII sitt henfall til et deamineringsprodukt. Det må imidlertid understrekes at alle de observasjonene sitert ovenfor er svake. De er heller ikke analysert på en tilstrekkelig forsvarlig måte for å kunne trekke sikre konklusjoner. Reaksjonsveien skissert i figur 5-4 er derfor kun spekulativt.



Figur 5-4: Mulig reaksjonsvei fra primærradikalet LII som dannes ved 6 K (et protonert karboksyl-anion), til romtemperaturprodukt. Romtemperaturproduktet er foreslått å kunne være et deamineringsprodukt [19], men det ble ikke observert i [22]. Sikre spektroskopiske observasjoner av radikal LII ble gjort ved 77 i dette studiet, men Coleman argumenterer for at dette radikalet henfaller ved rundt 146 K [19].

For dekarboksyleringsradikalet LIII er ENDOR-linjer sist observert ved 77 K, men den karakteriske bredden den forårsaker i EPR-spekteret forsvinner ikke før ved temperaturer over 210 K. Dekarboksyleringsradikaler er vanlige lavtemperaturreadikaler, men er sjeldent observert ved romtemperatur. Dekarboksyleringsprodukter vil ofte henfalle ved å abstrahere et hydrogenatom fra et nabomolekyl [9]. To av radikalene identifisert ved Knudtsen m.fl. sitt arbeid [22] er netto H-abstraksjonsradikaler; Radikal I med spinn på C3 i metylen-gruppen hvor H9 har blitt spaltet av, og Radikal II hvor spinnet er lokalisert til C2 etter abstraksjon av H8. Coleman foreslo også Radikal I som romradikalstruktur (kalt Radikal IV) [19], og observeres for første gang ved 210 K da han mener dekarboksyleringsradikalet henfaller. Close m.fl. [17] var den første som gjorde en sikker identifikasjon av dette radikalet i L-asparagin ved romtemperatur. Begge H-abstraksjonsradikalene identifisert av Knudtsen m.fl., Radikal I og Radikal II, samsvarer godt med det faktum at LIII er et primærradikal som henfaller ved å abstrahere et hydrogenatom fra et nabomolekyl. Forslag til reaksjonsvei for LIII er skissert i figur 5-5. Det kan heller ikke sees bort fra at karboksyl-anionet (LII) på ukjent vis henfaller til Radikal I eller Radikal II, siden foreslått reaksjonsvei (deamineringsprosessen) for LII er spekulativ.



Figur 5-5: Forslag til reaksjonsvei fra primærradikalet LIII ved 6 K som er et dekarboksyleringsprodukt, til romtemperaturprodukter. Radikal I er identifisert som et romtemperaturreadikal av både Knudtsen m.fl. [22], Coleman [19] og av Close m.fl. [17]. Radikal II er identifisert av Knudtsen m.fl.. Henfall av radikal LIII skjer i henhold til Coleman's observasjoner mellom 77 – 295 K, trolig mot høyere temperaturer (etter 210 K).

6 Oppsummering og forslag til videre arbeid

Det foreliggende arbeidet er et EPR/ENDOR/EIE-studie av både vanlige og deutrerete krystaller av L-asparagin bestrålt og målt ved 6 K. EPR-spektrene bestod av flere overlappende absorpsjonslinjer som et resultat av flere eksisterende radikaler, og karakteristiske trekk i spektrene var gjenkjennelige ved alle orienteringer av krystallen i magnetfeltet. Analyser av ENDOR-spektrene mellom 20-65 MHz resulterte i ni resonanslinjer som lot seg observere gjennom alle de tre rotasjonsplanene. Disse ni resonanslinjene hadde opphav i sju forskjellige hyperfinkoblinger. Analyser av observasjonene resulterte i seks hfvv-tensorer på β -form og en hfvv-tensor på α -form som beskriver disse koblingene. Grupperingen av koblinger som viste vekselvirkninger med samme spinn og dermed tilhører samme radikal, ble gjort på bakgrunn av EIE-spektre. I ENDOR-spektrene mellom 10-20 MHz ble det observert flere resonanslinjer som ikke lot seg måle og analysere, på grunn av en stor grad av overlapping. De fleste av disse skyldes svake hyperfinkoblinger, mens noen er lavfrekventgrenen av ENDOR-resonanser som ble analysert på bakgrunn av data for høyfrekventgrenen.

Studiets analyse resulterte i identifikasjon av tre lavtemperaturredikaler, detektert ved den samme temperaturen. Radikalene er benevnt LI, LII og LIII. Retninger for etablerte koblinger ble brukt til å foreslå radikalstrukturene. For LI antydte de to eksperimentelt etablerte β -koblingene sammen med to β -koblinger funnet ved molekylstrukturberegninger, at en reduksjonsprosess har ført til at O3 protoneres og radikalet er et protonert amid-anion med spinnnet lokalisert til C4. For LII antydte en eksperimentelt observert β -kobling sammen med en β -kobling funnet ved molekylstrukturberegningene, at en reduksjonsprosess som har ført til at karboksylgruppen protoneres og spinnnet lokaliseres til C1. Radikalet er et protonert karboksyl-anion. For LIII antydte de fire eksperimentelt observerte koblingene relatert til dette radikalet, tre β -koblinger og en α -kobling, at karboksylgruppen til L-asparagin spaltes av og radikalet er et dekarboksyleringsprodukt som antas å være et oksidasjonsprodukt. Molekylstrukturmodellering basert på DFT-beregninger for de tre radikalstrukturene støttet i stor grad tolkningene av de eksperimentelle data, og viste at disse for alle tre radikalene beskrev systemene godt. Da det ofte er store avvik mellom eksperimentelle og modellerte isotropverdier [10], må det understrekes at molekylstrukturberegningene generelt ga veldig gode resultater, både for isotropverdi, anisotrope verdier og egenvektorer.

Koblinger knyttet til alle de tre lavtemperaturreadikalerne er også observert ved 77 K, men ved denne temperaturen er det også gjort observasjoner som indikerer dannelse av nye uidentifiserte radikaler. Det er betydelige usikkerheter knyttet til overgangene mellom radikalene ved 6 og 77 K og de ved 295 K [22]. For å fullstendig forstå reaksjonsgangen med hensyn på radikaldannelser i aminosyren L-asparagin, vil det være nødvendig å foreta nye og grundige studier ved temperaturene 77 K, rundt 146-150 K og rundt 210 K. Klarhet i hvilke produkter som henfaller og hvilke produkter som dannes ved disse ”kritiske” temperaturene vil gi en økt forståelse av dannelsen av stabile romtemperaturprodukter, samt kunnskap om generell reaksjonsvei for radikaldannelse.

Ettersom LI er det eneste observerte radikalet med spinnet lokalisert til aminosyrens sidekjede, er dette radikalet det mest interessante når det gjelder mulige ladningsoverføringer mellom L-asparagin og DNA i nukleosomer, fordi det er amid-delen av L-asparagin som inngår i hydrogenbindinger med DNA-molekylet i nukleosomene. På tross av flere spekulasjoner om et slikt radikal tidligere, er dette første gang det er blitt knyttet sikre data til identifikasjon av et anion-radikal i sidekjeden til L-asparagin ved 6 K. I de fleste andre aminosyrer har det eneste reduksjonsproduktet ved lavtemperatur vært karboksyl-anionet (tilsvarende LII). Det foreliggende arbeidet viser at amid-gruppen til aminosyrens sidekjede må ha en sammenlignbar elektronaffinitet som den til en karboksylgruppe. Videre studier av dette radikalets struktur og reaksjoner oppmuntres det derfor spesielt til. Mekanismene for mulige spinn/ladningsoverføringer mellom protein og DNA er ikke kjent og kan muligens modelleres kvantekjemisk, i og med at eksperimentelle data kan være vanskelige å etablere da det ikke finnes et krystallsystem som simulerer kontakten mellom L-asparagin og DNA i nukleosomene.

Litteraturliste

1. Henriksen, T. og Biophysics group at UiO, *Radiation and Health*. 2009, revidert 2013. University of Oslo. Nettbasert.
<http://www.mn.uio.no/fysikk/tjenester/kunnskap/straling/radiation-and-health-2013.pdf>
2. Pettersen, E.O., *FYS-4720: Cellulær radiobiologi*. 2012, Universitetet i Oslo.
3. Hall, E.J. og A.J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*. 2006: Lippincott Williams & Wilkins.
4. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts og P. Walter, *Molecular Biology of The Cell, 5th ed*. 2008: Garland Science.
5. Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent og T. J. Richmond, 1997. *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. *Nature*, **389**(6648): 251-60.
6. Weiland, B. og J. Hüttermann, 2000. *Spin transfer from protein to DNA in X-irradiated 'dry' and hydrated chromatin: An electron spin resonance investigation of spectral components between 77 K and room temperature*. *International Journal of Radiation Biology*. **76**: 1075 - 1084.
7. Roginskaya, M., W.A. Bernhard, og Y. Razskazovskiy, 2006. *Protection of DNA against Direct Radiation Damage by Complex Formation with Positively Charge Polypeptides*. *Radiation Research*, **166**: 9-18.
8. Sagstuen, E., D. M. Close, R. Vågane, E. O. Hole, W. H. Nelson, 2006. *Electron transfer in amino acid-nucleic acid base complexes: EPR, ENDOR, and DFT study of X-irradiated N-formylglycine-cytosine complex crystals*. *The Journal of Physical Chemistry A*, **110**(28): 8653-8662.
9. Sagstuen, E., A. Sanderud, og E. O. Hole, 2004. *The solid state radiation chemistry of simple amino acids, revisited*. *Radiation Research*, **162**: 112 - 119
10. Pauwels, E., 2014 (innsendt for publikasjon). *Uncovering radiation chemistry in the solid state through periodic density-functional calculations: confrontation with experimental results and beyond*, in *Applications of EPR in Radiation Research*, M. Shiotani og A. Lund, redaktører, Springer: Berlin.
11. Ban, F., J. W. Gauld, S. D. Wetmore og R. J. Boyd, 2003. *The Calculation of the Hyperfine Coupling Tensors of Biological Radicals*, in *EPR og Free Radicals in*

- Solids I. Trends in Methods and Applications.*, A. Lund and M. Shiotani, Redaktører. Springer: Berlin.
12. Krivokapic, A., S. G. Aalbergsjø, H. De Cooman, E. O. Hole, W. Nelson og E. Sagstuen, 2014. *Lithium Formate for EPR Dosimetry: Radiation-Induced Radical Trapping at Low Temperatures*. Radiation Research. **181**(5): 503-11.
 13. Aalbergsjø, S.G., E. Pauwels, D. De Cooman, E. O. Hole og E. Sagstuen, 2013. *Structural specificity of alkoxy radical formation in crystalline carbohydrates*. Physical Chemistry Chemical Physics. **15**(24): 9615-9619.
 14. Vrielinck, H., H. De Cooman, F. Callens og E. Sagstuen, 2014, innsendt for publikasjon. *Radiation Chemistry of Solid-State Carbohydrates Using EMR*, in *Applications of EPR in Radiation Research*, M. Shiotani and A. Lund, Editors. Springer: Berlin.
 15. Luscombe, N.M., R.A. Laskowski, og J.M. Thornton, 2001. *Amino acid-base interactions: a three dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level*. Nucleic Acids Research. **29**: 2860-2874.
 16. Sevilla, M.D., 1970. *Radicals formed by the reaction of electrons with amino acids in alkaline glass*. Journal of Physical Chemistry. **74**(10): 2096-2102.
 17. Close, D.M., G.W. Fouse, og W.A. Bernhard, 1976. *ESR and ENDOR study of single crystals of l-asparagine.H₂O X-irradiated at room temperature*. Journal of Chemical Physics. **66**(4): 1534-1540.
 18. Moulton, G.C. og J.M. Coleman, 1984. *An ESR-ENDOR study of l-asparagine. H₂O single crystals X-irradiated at 77 K*. Journal of Chemical Physics. **80**(10): 4748-4752.
 19. Coleman, J.M., 1985. *An ESR and ENDOR study of the effects of x-irradiation upon single crystals of l-asparagine monohydrate from 4.2 K to room temperature.*, in *Department of Physics*, Florida State University.
 20. Hampton, D.A. og C. Alexander Jr, 1973. *ENDOR and ESR studies of irradiated cytidine*. The Journal of chemical physics. **58**(11): 4891-4898.
 21. Knudtsen, I.S., 2008. *Strålingsinduserte radikaler i énkrystaller av l-asparagin monohydrat ved 295 K*. Fysisk institutt, Universitetet i Oslo.
 22. Knudtsen, I.S., S. G. Aalbergsjø, E. O. Hole og E. Sagstuen, 2014, innsendt for publikasjon. *Radiation effects on crystalline L-asparagine, revisited: Radical formation by EMR and periodic DFT after X-irradiation at 295 K*. Radiation Physics and Chemistry.
 23. Weil, J.A. og J.R. Bolton, 2007. *Electron Paramagnetic Resonance, Elementary*

- Theory and Practical Applications*. 2 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
24. Malinen, E. og E. Sagstuen, 2001. *FYS390- Elektron spinn resonans (ESR) spektroskopi*. Vol. 1.0.
 25. Cramer, C.J., 2004. *Essentials of computational chemistry: theories and models*. Chichester, West Sussex, England: Wiley. xx, 596 s. : ill.
 26. Hansen, E.W. og B. Pedersen, 2014. *FYS-KJM4740 MR Spectroscopy and Tomography- Part I*. Department of Chemistry, University of Oslo. Kan lastes ned fra <http://www.uio.no/studier/emner/matnat/fys/FYS-KJM4740/v14/kompendium/kompendium-nmr-english-2014.pdf> pr. 13.4.2014.
 27. Atherton, N.M., 1993. *Principles of Electron Spin Resonance*. Great Britain: Ellis Horwood Limited.
 28. McConnell, H.M. og D.B. Chesnut, 1958. *Theory of isotropic hyperfine interactions in π -electron radicals*. Journal of Chemical Physics. **28**(1): 107-117.
 29. Bernhard, W.A., 1984. *The use of alpha hyperfine coupling tensors as a measure of unpaired spin density and free radical geometry*. The Journal of Chemical Physics. **81**(12): 5928-5936.
 30. Gordy, W., 1980. *Theory and Applications of Electron Spin Resonance*. Techniques of Chemistry. **XV** (John Wiley & Sons).
 31. Erling, P. og W. Nelson, 2004. *Dependence of α -Proton Hyperfine Couplings on Free Radical Geometry*. The journal of physical chemistry. A. **108**(37): 7591-7595.
 32. Heller, C. og H.M. McConnell, 1960. *Radiation damage in organic crystals. II. Electron spin resonance of $(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})$ in β -succinic acid*. Journal of Chemical Physics. **32**: 1535-9.
 33. Sagstuen, E., E. O. Hole, S. R. Haugedal og W. H. Nelson, 1997. *Alanine radicals: Structure determination by EPR and ENDOR of single crystals X-irradiated at 295 K*. The Journal of Physical Chemistry A. **101**(50): 9763-9772.
 34. Bernhard, W.A., 1981. *Solid-state radiation chemistry of DNA: The bases*, in *Advances in Radiation Biology*, J.T. Lett og H. Adler, Editors. Academic Press: New York, NY. 199-280.
 35. Hohenberg, P. og W. Kohn, 1964. *Inhomogeneous Electron Gas**. Physical Review. **136**(3B): 864-871.
 36. Kohn, W. og J. Sham, 1965. *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects**. Physical Review. **140**(4A): 1133-1138.

37. http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Quantum_Mechanics/Atomic_Theory/Electrons_in_Atoms/Electronic_Orbitals, 2.6.2014.
38. Godbout, N., D. R. Salahub, J. Andzelm og E. Wimmer, 1992. *Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation*. Canadian journal of chemistry. **70**(2): 560-571.
39. VandeVondele, J., M. Krack, F. Mohamed, M. Parrinello, T. Chassaing og J. Hutter, 2005. *QUICKSTEP: Fast and accurate density functional calculations using a mixed Gaussian and plane waves approach*. Computer Physics Communications. **167**(2): 103-128.
40. Lippert, G., J. Hutter, and M. Parrinello, 1999. *The Gaussian and augmented-plane-wave density functional method for ab initio molecular dynamics simulations*. Theoretical Chemistry Accounts. **103**(2): 124-140.
41. Becke, A.D., 1988. *Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior*. Physical Review A. **38**(6): 3098 - 3100.
42. Lee, C., W. Yang, og R.G. Parr, 1978. *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Physical Review B. **37**(2): 785-789.
43. Sybesma, C., 1989. *Biophysics, An Introduction*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
44. Verbist, J.J., M. S. Lehmann, T. F. Koetzle og W. C. Hamilton, 1972. *Precision neutron diffraction structure determination of protein and nucleic acid components. VI. The crystal and molecular structure of the amino acid L-asparagine monohydrate*. Acta crystallographica. Section B, Structural crystallography and crystal chemistry. **B 28**(OCT15): 3006-3013.
45. Sagstuen, E. og E.O. Hole, 2009. *Radiation Produced Radicals*, in *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, M. Brustolon oh E. Giamello, Redaktører. J. Wiley & Sons.
46. Nelson, W.H., 1980. *Estimation of errors in eigenvectors and eigenvalues from magnetic resonance results using linear data-fitting techniques*. Journal of Magnetic Resonance. **38**: 71 - 78.
47. Vrielinck, H., H. De Coomen, M. A. Tarpan, E. Sagstuen, M. Waroquier og F. Callens, 2008. *Schonland ambiguity in the electron nuclear double resonance analysis*

- of hyperfine interactions : principles and practice*. Journal of Magnetic Resonance. **195**: 196 - 205.
48. CP2K version 2.3: The CP2K developers Group (2012). Freely available from <http://www.cp2k.org/>.
 49. VandeVondele, J. og J. Hutter, 2007. *Gaussian basis sets for accurate calculations on molecular systems in gas and condensed phases*. Journal of Chemical Physics. **127**(11): 114105.
 50. Goedecker, S., M. Teter, og J. Hutter, 1996. *Separable dual-space Gaussian pseudopotentials*. Physical Review B. **54**(3): 1703 - 1710.
 51. Hartwigsen, C., S. Goedecker, og J. Hutter, 1998. *Relativistic separable dual-space Gaussian pseudopotentials from H to Rn*. Physical Review B. **58**(7): 3641 - 3662.
 52. Krack, M., 2005. *Pseudopotentials from H to Kr optimised for gradient-corrected exchange-correlation effects*. Theoretical Chemistry Accounts. **114**: 145 - 152.
 53. Chemdraw. Versjon 7.01, Cambridge Soft Corporation.
 54. KVASAT. Einar Sagstuen, Anders Lund, Yoshiteru Itagaki and Jean Maruani. *Weakly Coupled Proton Interactions in the Malonic Acid Radical: Single Crystal ENDOR Analysis and EPR Simulation at Microwave Saturation*. Journal of Physical Chemistry A **104**, 6362-6371 (2000).
 55. Humphrey, W.D., Dalke, A. og Schulten, K., 1996. *VMD - Visual Molecular Dynamics*, in *J. Molec. Graphics*. 33-38, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.
 56. WinEPR. Versjon 2.11, Bruker-Frantzen Analytik GmbH (1996).
 57. Xepr. Bruker BioSpin GmGh. Versjon 2.2b.47 adapted for RedHat Linux ver 7.3.
 58. Sanderud, A. og E. Sagstuen, 1996. *EPR and ENDOR Studies of H(1) and N(14) Hyperfine and Quadrupolar Couplings in Crystals of L-O-Serine Phosphate after X-Irradiation at 295 K*. Phys. Chem. **100**: 9545-9555.
 59. Hermocilla, L., P. Calle, og de la Vega JMP, 2006. *Density functional theory study of N-14 isotropic hyperfine coupling constants of organic radicals*. J Phys Chem A. **110**(50): 13600-13608.
 60. Zhou, Y. og W.H. Nelson, 2010. *Free radicals in l-arginine-HCl·H₂O single crystals X-irradiated at 66 K- EPR, ENDOR, EIE and DFT studies*. The Journal of Physical Chemistry B. **114**(16): 5567-5582.
 61. Zhou, Y. og W.H. Nelson, 2010. *EPR, ENDOR and DFT study of l-lysine-HCl·2H₂O single crystals X-irradiated at 66 K*. Radiation Physics and Chemistry. **79**(4): 479-489.
 62. Strzelczak, G., J. Bergès, C. Houée-Levin, D. Pogocki og K. Bobrowski, 2007. *EPR*

- spectroscopy and theoretical study of γ -irradiated asparagine and aspartic acid in solid state*. Biophysical Chemistry. **125**(1): 92-103.
63. Øhman, K.T., A. Sanderud, E. O. Hole og E. Sagstuen, 2006. *Single crystals of L-O-serine phosphate X-irradiated at low temperatures: EPR, ENDOR, EIE, and DFT studies*. Phys. Chem. **A**(110): 9585-9596.
64. Lipfert, J., J. Llano, og L.A. Eriksson, 2004. *Radiation-induced damage in serine phosphates - insights into a mechanism for direct DNA strand breakage*. Phys. Chem.. **B**(108): 8036-8042.

Appendiks

A: KRYSTALLOGRAFISKE DATA

L-asparagin monohydrat. Acta Cryst B28. 3006-3013 (1972) [44]

KRYSTALLPARAMETRE:

A0= 5.593

B0= 9.827

C0=11.808

DEN MONOKLINE VINKEL BETA ER 90.000 GRADER (ortorombisk P212121)

ANTALL ATOMER ER 20

ATOMKOORDINATER. INPUTTDATA (I fraksjon av krystallakser)

NR	ATOM	X/A0	Y/B0	Z/C0
1	c1	-.1246	-.0576	.0356
2	c2	-.3075	-.0278	.1297
3	c3	-.2092	.0567	.2271
4	c4	.0164	-.0021	.2792
5	N1	-.4165	-.1566	.1716
6	N2	.1050	.0642	.3682
7	O1	-.0055	.0428	.0007
8	O2	-.1188	-.1747	-.0040
9	O3	.1107	-.1056	.2391
10	O4	.3022	.2302	.1121
11	H1	.1875	.1742	.0732
12	H2	.3504	.3020	.0624
13	H3	-.3135	-.2030	.2328
14	H4	-.4453	-.2246	.1056
15	H5	-.5827	-.1370	.2074
16	H6	.2530	.0268	.4091
17	H7	.0258	.1496	.3972
18	H8	-.4519	.0315	.0901
19	H9	-.1696	.1591	.1978
20	H10	-.3439	.0683	.2932

O4. H1. H2 (10.11 og 12) er krystallvannet.

KOORDINATER (ångström enheter). KOORDINATSYSTEM <A B C>

ATOM NR.	ATOM	X	Y	Z
1	c1	-.6971	-.5661	.4210
2	c2	-1.7196	-.2731	1.5314
3	c3	-1.1699	.5571	2.6821
4	c4	.0917	-.0203	3.2967
5	N1	-2.3297	-1.5387	2.0265
6	N2	.5874	.6307	4.3476
7	O1	-.0306	.4209	.0078
8	O2	-.6645	-1.7170	-.0469
9	O3	.6192	-1.0380	2.8231
10	O4	1.6904	2.2620	1.3241
11	H1	1.0487	1.7120	.8646
12	H2	1.9596	2.9678	.7371
13	H3	-1.7533	-1.9944	2.7489
14	H4	-2.4907	-2.2076	1.2468
15	H5	-3.2590	-1.3466	2.4486
16	H6	1.4150	.2634	4.8308
17	H7	.1444	1.4703	4.6895
18	H8	-2.5274	.3096	1.0639
19	H9	-.9483	1.5634	2.3353
20	H10	-1.9237	.6709	3.4627

BINDINGSAVSTANDER OG RETNINGSKOSER

BINDING	AVSTAND	R1	R2	R3
c2 -c1 (2- 1)	1.5377	.6650	-.1906	-.7221
c3 -c1 (3- 1)	2.5686	.1841	-.4373	-.8803
c4 -c1 (4- 1)	3.0315	-.2602	-.1800	-.9486
N1 -c1 (5- 1)	2.4878	.6562	.3909	-.6454
O1 -c1 (7- 1)	1.2606	-.5287	-.7830	.3278
O2 -c1 (8- 1)	1.2427	-.0262	.9261	.3765
O3 -c1 (9- 1)	2.7795	-.4736	.1698	-.8642
O4 -c1 (10- 1)	3.8098	-.6267	-.7423	-.2371
H1 -c1 (11- 1)	2.9042	-.6011	-.7844	-.1528
H3 -c1 (13- 1)	2.9283	.3607	.4877	-.7950
H4 -c1 (14- 1)	2.5678	.6985	.6393	-.3216
H5 -c1 (15- 1)	3.3592	.7627	.2323	-.6036

H8	-c1	(18- 1)	2.1285	.8599	-.4115	-.3021
H9	-c1	(19- 1)	2.8745	.0874	-.7408	-.6660
H10	-c1	(20- 1)	3.5053	.3499	-.3529	-.8678
c3	-c2	(3- 2)	1.5217	-.3613	-.5456	-.7562
c4	-c2	(4- 2)	2.5418	-.7126	-.0994	-.6945
N1	-c2	(5- 2)	1.4897	.4095	.8496	-.3324
N2	-c2	(6- 2)	3.7510	-.6150	-.2409	-.7508
O1	-c2	(7- 2)	2.3781	-.7102	-.2918	.6407
O2	-c2	(8- 2)	2.3852	-.4424	.6054	.6617
O3	-c2	(9- 2)	2.7791	-.8416	.2752	-.4648
H1	-c2	(11- 2)	3.4711	-.7975	-.5719	.1921
H3	-c2	(13- 2)	2.1086	.0160	.8163	-.5774
H4	-c2	(14- 2)	2.1019	.3669	.9204	.1354
H5	-c2	(15- 2)	2.0889	.7369	.5139	-.4391
H8	-c2	(18- 2)	1.1003	.7342	-.5296	.4249
H9	-c2	(19- 2)	2.1480	-.3591	-.8550	-.3743
H10	-c2	(20- 2)	2.1593	.0945	-.4372	-.8944
c4	-c3	(4- 3)	1.5175	-.8314	.3805	-.4050
N1	-c3	(5- 3)	2.4834	.4670	.8439	.2640
N2	-c3	(6- 3)	2.4223	-.7255	-.0304	-.6876
O1	-c3	(7- 3)	2.9100	-.3915	.0468	.9190
O2	-c3	(8- 3)	3.5880	-.1409	.6338	.7606
O3	-c3	(9- 3)	2.4011	-.7451	.6643	-.0587
O4	-c3	(10- 3)	3.5961	-.7954	-.4741	.3776
H1	-c3	(11- 3)	3.0918	-.7176	-.3735	.5878
H3	-c3	(13- 3)	2.6182	.2228	.9745	-.0255
H4	-c3	(14- 3)	3.3835	.3904	.8171	.4242
H5	-c3	(15- 3)	2.8360	.7366	.6712	.0823
H6	-c3	(16- 3)	3.3742	-.7661	.0871	-.6368
H7	-c3	(17- 3)	2.5673	-.5119	-.3557	-.7819
H8	-c3	(18- 3)	2.1266	.6383	.1164	.7609
H9	-c3	(19- 3)	1.0872	-.2038	-.9256	.3190
H10	-c3	(20- 3)	1.0911	.6908	-.1043	-.7155
N1	-c4	(5- 4)	3.1276	.7742	.4855	.4061
N2	-c4	(6- 4)	1.3319	-.3722	-.4888	-.7890
O1	-c4	(7- 4)	3.3206	.0368	-.1329	.9904
O2	-c4	(8- 4)	3.8249	.1977	.4436	.8742
O3	-c4	(9- 4)	1.2403	-.4253	.8205	.3819
O4	-c4	(10- 4)	3.4141	-.4683	-.6685	.5778
H1	-c4	(11- 4)	3.1356	-.3052	-.5525	.7756
H3	-c4	(13- 4)	2.7570	.6692	.7160	.1987
H4	-c4	(14- 4)	3.9566	.6527	.5528	.5181
H5	-c4	(15- 4)	3.7021	.9051	.3582	.2291
H6	-c4	(16- 4)	2.0458	-.6469	-.1387	-.7499
H7	-c4	(17- 4)	2.0408	-.0258	-.7304	-.6825
H8	-c4	(18- 4)	3.4574	.7575	-.0954	.6458
H9	-c4	(19- 4)	2.1246	.4895	-.7454	.4525
H10	-c4	(20- 4)	2.1370	.9430	-.3235	-.0777
O1	-N1	(7- 5)	3.6333	-.6328	-.5393	.5556
O2	-N1	(8- 5)	2.6652	-.6248	.0669	.7779

O3	-N1	(9- 5)	3.0954	-.9527	-.1618	-.2573
H3	-N1	(13- 5)	1.0304	-.5594	.4422	-.7011
H4	-N1	(14- 5)	1.0399	.1549	.6433	.7498
H5	-N1	(15- 5)	1.0386	.8948	-.1850	-.4064
H8	-N1	(18- 5)	2.0933	.0944	-.8830	.4598
H9	-N1	(19- 5)	3.4098	-.4051	-.9098	-.0906
H10	-N1	(20- 5)	2.6664	-.1523	-.8287	-.5386
O3	-N2	(9- 6)	2.2605	-.0141	.7382	.6744
O4	-N2	(10- 6)	3.6082	-.3057	-.4521	.8379
H1	-N2	(11- 6)	3.6760	-.1255	-.2941	.9475
H3	-N2	(13- 6)	3.8634	.6059	.6795	.4138
H6	-N2	(16- 6)	1.0263	-.8064	.3579	-.4708
H7	-N2	(17- 6)	1.0091	.4391	-.8321	-.3389
H9	-N2	(19- 6)	2.6977	.5693	-.3457	.7459
H10	-N2	(20- 6)	2.6627	.9430	-.0151	.3323
O2	-O1	(8- 7)	2.2305	.2842	.9585	.0245
O3	-O1	(9- 7)	3.2367	-.2008	.4507	-.8698
O4	-O1	(10- 7)	2.8433	-.6053	-.6475	-.4630
H1	-O1	(11- 7)	1.8884	-.5716	-.6837	-.4537
H2	-O1	(12- 7)	3.3135	-.6006	-.7686	-.2201
H4	-O1	(14- 7)	3.8074	.6461	.6904	-.3254
H8	-O1	(18- 7)	2.7132	.9202	.0410	-.3892
H9	-O1	(19- 7)	2.7504	.3336	-.4154	-.8462
H10	-O1	(20- 7)	3.9474	.4796	-.0633	-.8752
O3	-O2	(9- 8)	3.2164	-.3991	-.2111	-.8923
H1	-O2	(11- 8)	3.9400	-.4348	-.8703	-.2313
H3	-O2	(13- 8)	3.0131	.3614	.0921	-.9279
H4	-O2	(14- 8)	2.2912	.7971	.2142	-.5646
H5	-O2	(15- 8)	3.6189	.7169	-.1023	-.6896
H8	-O2	(18- 8)	2.9684	.6276	-.6827	-.3742
O4	-O3	(10- 9)	3.7795	-.2834	-.8731	.3966
H1	-O3	(11- 9)	3.4033	-.1262	-.8080	.5755
H3	-O3	(13- 9)	2.5591	.9271	.3737	.0290
H4	-O3	(14- 9)	3.6775	.8457	.3180	.4286
H5	-O3	(15- 9)	3.9085	.9923	.0789	.0958
H6	-O3	(16- 9)	2.5215	-.3156	-.5161	-.7962
H7	-O3	(17- 9)	3.1624	.1502	-.7932	-.5902
H8	-O3	(18- 9)	3.8486	.8176	-.3502	.4571
H9	-O3	(19- 9)	3.0761	.5096	-.8457	.1586
H10	-O3	(20- 9)	3.1298	.8125	-.5460	-.2044
H1	-O4	(11- 10)	.9621	.6671	.5717	.4777
H2	-O4	(12- 10)	.9567	-.2814	-.7377	.6137
H7	-O4	(17- 10)	3.7872	.4082	.2090	-.8886
H9	-O4	(19- 10)	2.9109	.9065	.2400	-.3474
H2	-H1	(12- 11)	1.5566	-.5852	-.8067	.0819
H7	-H1	(17- 11)	3.9378	.2297	.0614	-.9713
H8	-H1	(18- 11)	3.8464	.9297	.3646	-.0518
H9	-H1	(19- 11)	2.4845	.8038	.0598	-.5919
H9	-H2	(19- 12)	3.6031	.8071	.3898	-.4436
H4	-H3	(14- 13)	1.6869	.4371	.1264	.8905

H5 -H3	(15- 13)	1.6664	.9036	-.3887	.1802
H8 -H3	(18- 13)	2.9575	.2617	-.7790	.5697
H9 -H3	(19- 13)	3.6711	-.2193	-.9691	.1127
H10 -H3	(20- 13)	2.7645	.0616	-.9641	-.2582
H5 -H4	(15- 14)	1.6662	.4611	-.5168	-.7213
H8 -H4	(18- 14)	2.5242	.0145	-.9973	.0725
H10 -H4	(20- 14)	3.6766	-.1542	-.7829	-.6027
H8 -H5	(18- 15)	2.2794	-.3210	-.7266	.6075
H9 -H5	(19- 15)	3.7176	-.6216	-.7828	.0305
H10 -H5	(20- 15)	2.6233	-.5090	-.7691	-.3866
H7 -H6	(17- 16)	1.7582	.7227	-.6865	.0803
H9 -H6	(19- 16)	3.6746	.6431	-.3538	.6791
H10 -H6	(20- 16)	3.6311	.9195	-.1122	.3768
H9 -H7	(19- 17)	2.5971	.4207	-.0358	.9065
H10 -H7	(20- 17)	2.5340	.8161	.3155	.4842
H9 -H8	(19- 18)	2.3837	-.6625	-.5260	-.5334
H10 -H8	(20- 18)	2.4998	-.2415	-.1445	-.9596
H10 -H9	(20- 19)	1.7375	.5614	.5137	-.6489

B: OPTIMALISERTE VINKLER

	θ [grader]	φ [grader]	α [grader]
Rot <a> H ₂ O	89.65	-.19	-.02
Rot H ₂ O	90.50	89.49	.27
Rot <c> H ₂ O	.12	.41	X
Rot <a> D ₂ O	89.67	-3.59	2.09

C: SCHONLANDVARIANTER

De to Schonlandvariantene (SV1 og SV2) for hver eksperimentelt etablert hyperfinvekselvirkningstensorer. Tallene i parentes viser usikkerheten i siste siffer.

Tensor	Prinsipalverdier [MHz]	Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]
#1 SV1	88.69 (2)	81.76 (1)	6.93 (2)
	79.69 (2)		-2.07 (2)
	76.90 (2)		-4.86 (2)
#1 SV2	87.06 (2)	81.73 (1)	5.33 (2)
	83.43 (2)		1.70 (2)
	74.69 (2)		-7.04 (2)
#2 SV1	72.66 (2)	65.29 (1)	7.37 (2)
	62.76 (2)		-2.53 (2)
	60.44 (2)		-4.85 (2)
#2 SV2	72.57 (2)	65.29 (1)	7.28 (2)
	63.48 (2)		-1.81 (2)
	59.82 (2)		-5.47 (2)
#3 SV1	95.00 (2)	85.31 (1)	9.69 (2)
	83.69 (2)		-1.62 (2)
	77.25 (2)		-8.06 (2)
#3 SV2	93.16 (3)	85.28 (2)	7.88 (4)
	87.62 (2)		2.34 (3)
	75.05 (2)		-10.23 (3)
#5 SV1	128.05 (2)	120.73 (1)	7.32 (2)
	119.11 (2)		-1.62 (2)
	115.04 (2)		-5.69 (2)
#5 SV2	128.06 (2)	120.76 (1)	7.30 (2)
	119.25 (2)		-1.51 (2)
	114.98 (2)		-5.78 (2)
#6 SV1	-89.08 (5)	-53.67 (2)	-35.42 (6)
	-51.97 (4)		1.70 (5)
	-19.95 (4)		33.72 (6)
#6 SV2	-90.52 (5)	-54.14 (2)	-36.38 (6)
	-38.49 (4)		15.65 (5)
	-33.42 (4)		20.72 (6)
#7 SV1	51.03 (2)	39.16 (1)	11.87 (2)
	33.81 (2)		-5.35 (2)
	32.64 (2)		-6.52 (2)
#7 SV2	50.55 (2)	39.08 (1)	11.47 (2)
	37.14 (2)		-1.94 (2)
	29.55 (2)		-9.53 (2)
#8 SV1	47.00 (3)	36.67 (2)	10.33 (4)
	32.83 (3)		-3.84 (4)
	30.14 (3)		-6.53 (4)
#8 SV2	46.87 (3)	36.60 (2)	10.27 (4)
	33.75 (3)		-2.85 (4)
	29.17 (3)		-7.43 (4)

D: MODELLERTE HYPERFINVEKSELVIRKNINGSTENSORER

Tabell D.1: Beregnede hyperfinvekselvirkningstensorer for radikal LI.

Atom	Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor		
			<a>		<c>
N1	-0.2	-0.3	-0.684	0.352	0.639
		-0.1	-0.342	-0.928	0.145
		0.4	-0.644	0.119	-0.756
N2	0.7	-7.4	0.707	-0.692	0.144
		-7.0	0.309	0.486	0.817
		14.4	0.636	0.533	-0.558
H3	-0.4	-4.3	-0.529	-0.002	0.848
		-4.0	-0.545	0.768	-0.338
		8.3	-0.651	-0.641	-0.407
H4	0.5	-1.2	-0.596	-0.245	0.764
		-0.9	0.548	-0.820	0.165
		2.1	-0.586	-0.517	-0.623
H5	-0.1	-1.6	-0.170	-0.455	0.874
		-1.3	0.349	-0.857	-0.379
		2.9	0.922	0.240	0.305
H6	22.3	-8.6	-0.258	0.713	0.652
		-5.3	0.500	0.676	-0.541
		13.9	-0.827	0.186	-0.531
H7	-2.5	-9.3	0.620	-0.252	0.743
		-3.6	0.763	0.414	-0.497
		12.9	-0.182	0.875	0.448
H8	-0.7	-1.6	0.592	-0.453	-0.666
		-1.0	0.371	0.888	-0.273
		2.6	-0.715	0.085	-0.694
H9	76.4	-4.8	-0.557	0.303	0.773
		-2.2	0.734	0.615	0.287
		7.0	-0.388	0.728	-0.565
H10	35.6	-5.9	0.138	0.401	0.906
		-4.1	-0.499	-0.762	0.413
		10.0	0.856	-0.509	0.095
H5'	42.1	-7.810	-0.097	-0.895	0.435
		-4.833	-0.200	-0.410	-0.890
		12.643	0.975	-0.174	-0.139

Tabell D.2: Beregnede hyperfinvekselvirkningstensorer for radikal LII, hvor H1 er overført til O1.

Atom	Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor		
			<a>		<c>
N1	0.6	-0.2	-0.226	-0.748	0.623
		-0.2	0.584	-0.616	-0.528
		0.4	0.780	0.245	0.576
N2	1.5	-0.2	-0.796	-0.360	-0.486
		-0.1	-0.538	0.789	0.297
		0.2	-0.276	-0.498	0.822
H1	5.1	-9.2	0.874	-0.288	0.391
		-5.6	-0.300	0.314	0.901
		14.8	0.382	0.905	-0.188
H2	0.1	-1.2	0.141	-0.030	0.990
		-0.6	0.890	-0.434	-0.140
		1.7	0.434	0.900	-0.034
H3	0.5	-2.3	0.147	-0.900	0.409
		-2.2	0.839	-0.106	-0.534
		4.5	0.524	0.422	0.740
H4	0.5	-3.2	0.626	-0.597	-0.501
		-2.8	0.051	-0.610	0.791
		5.9	0.778	0.521	0.352
H5	-1.0	-1.8	-0.416	-0.427	0.803
		-1.2	-0.417	0.874	0.248
		3.0	-0.808	-0.232	-0.542
H6	-0.1	-0.8	-0.731	0.678	-0.072
		-0.7	0.608	0.696	0.381
		1.4	-0.309	-0.235	0.922
H7	0.5	-0.8	0.994	-0.048	0.099
		-0.4	-0.004	0.886	0.464
		1.3	0.110	0.461	-0.880
H8	54.4	-4.9	-0.502	-0.771	0.391
		-2.4	-0.006	0.455	0.890
		7.3	0.865	-0.445	0.233
H9	-0.5	-2.4	-0.455	0.459	0.763
		-2.3	-0.881	-0.356	-0.311
		4.6	0.128	-0.814	0.567
H10	-1.9	-1.7	0.525	0.841	0.131
		-1.3	0.755	-0.390	-0.527
		3.1	-0.392	0.376	-0.840

Tabell D.3: Beregnede hyperfinvekselvirkningstensorer for radikal LII, hvor H4' er overført til O2.

Atom	Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor		
			<a>		<c>
N1	1.6	-0.2	-0.506	-0.279	0.816
		-0.2	0.392	-0.917	-0.070
		0.4	-0.768	-0.285	-0.573
N2	1.8	-0.1	-0.871	-0.185	-0.456
		-0.1	-0.381	0.840	0.386
		0.2	-0.312	-0.510	0.802
H3	-0.1	-2.4	-0.443	-0.610	0.657
		-2.2	-0.725	0.675	0.137
		4.6	-0.527	-0.415	-0.742
H4	-0.2	-2.9	-0.220	-0.201	0.955
		-2.7	0.581	-0.813	-0.037
		5.7	0.784	0.546	0.295
H5	-1.7	-1.8	-0.320	-0.591	0.740
		-1.2	-0.499	0.769	0.399
		2.9	-0.806	-0.241	-0.541
H6	-0.1	-0.7	-0.660	0.750	-0.033
		-0.7	-0.682	-0.618	-0.391
		1.4	-0.314	-0.236	0.920
H7	0.6	-0.8	0.995	-0.036	0.090
		-0.4	-0.008	0.894	0.447
		1.3	0.097	0.446	-0.890
H8	63.6	-4.6	-0.485	-0.732	0.479
		-2.7	-0.027	0.561	0.828
		7.2	0.874	-0.388	0.292
H9	-0.6	-2.5	-0.944	0.094	0.315
		-2.2	0.307	0.595	0.743
		4.7	0.117	-0.798	0.591
H10	-2.0	-1.8	0.566	0.818	0.101
		-1.4	0.726	-0.436	-0.532
		3.2	-0.392	0.374	-0.841
H4'	11.9	-9.0	0.126	0.834	0.537
		-7.2	-0.946	-0.063	0.319
		16.2	0.299	-0.548	0.781

Tabell D.4: Beregnede hyperfinvekselvirkningstensorer for radikal LIII, tilnærming A.

Atom	Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor		
			<a>		<c>
N1	-5.5	-1.8	-0.578	-0.201	-0.791
		-1.4	0.084	-0.979	0.187
		3.2	0.812	-0.041	-0.582
N2	-0.4	-0.2	0.284	-0.945	-0.163
		-0.1	-0.931	-0.312	0.188
		0.3	-0.228	0.099	-0.969
H3	4.1	-5.1	0.589	0.529	0.611
		-4.4	0.806	-0.338	-0.485
		9.5	-0.050	0.778	-0.626
H4	40.9	-6.3	0.919	-0.361	-0.158
		-5.1	0.045	-0.302	0.952
		11.4	0.391	0.882	0.261
H5	85.9	-8.1	0.301	0.190	0.935
		-1.4	-0.443	0.896	-0.039
		9.5	-0.845	-0.402	0.354
H6	1.0	-1.1	0.146	0.962	-0.233
		-0.6	-0.499	0.275	0.822
		1.7	0.854	-0.003	0.520
H7	0.5	-1.4	-0.163	-0.799	0.579
		-0.9	0.775	-0.466	-0.426
		2.2	0.610	0.379	0.695
H8	-37.3	-35.4	0.490	0.858	0.156
		-2.6	0.667	-0.253	-0.701
		38.0	-0.562	0.447	-0.696
H9	4.9	-5.3	0.602	-0.484	0.635
		-4.0	-0.680	0.106	0.725
		9.2	-0.418	-0.869	-0.265
H10	121.1	-5.7	-0.341	0.846	-0.408
		-1.5	0.939	0.293	-0.178
		7.2	0.031	0.444	0.895

Tabell D.5: Beregnede hyperfinvekselvirkningstensorer for radikal LIII, tilnærming **B**.

Atom	Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor		
			<a>		<c>
N1	-6.2	-1.8	-0.495	-0.241	-0.835
		-1.3	-0.101	-0.938	0.331
		3.1	0.863	-0.249	-0.440
N2	-0.4	-0.2	-0.186	-0.966	0.179
		-0.2	0.929	-0.232	-0.288
		0.4	0.320	0.112	0.941
H3	19.6	-5.5	0.977	-0.174	-0.121
		-4.9	0.209	0.688	0.695
		10.4	0.038	0.704	-0.709
H4	26.3	-6.2	0.878	-0.428	-0.213
		-5.2	0.094	-0.282	0.955
		11.5	0.469	0.858	0.207
H5	105.5	-8.0	0.358	0.209	0.910
		-2.2	-0.353	0.933	-0.075
		10.2	-0.864	-0.294	0.408
H6	2.1	-1.2	0.224	0.910	-0.349
		-0.6	-0.578	0.413	0.704
		1.7	0.785	0.044	0.618
H7	0.8	-1.4	-0.288	-0.722	0.629
		-1.0	0.798	-0.545	-0.260
		2.4	0.530	0.427	0.733
H8	-47.3	-37.6	0.511	0.854	0.096
		-2.0	0.763	-0.399	-0.508
		39.6	-0.396	0.332	-0.856
H9	2.1	-5.3	0.414	-0.429	0.803
		-4.1	-0.808	0.233	0.541
		9.4	-0.419	-0.873	-0.251
H10	110.1	-5.2	0.334	-0.808	0.486
		-2.4	0.942	0.264	-0.208
		7.7	0.040	0.527	0.849

Tabell D.6: Beregnede hyperfinvekselvirkningstensorer for radikal LIII, tilnærming C.

Atom	Isotropverdi [MHz]	Anisotrope verdier [MHz]	Egenvektor		
			<a>		<c>
N1	-6.5	-1.8	-0.495	-0.233	-0.837
		-1.3	-0.108	-0.939	0.325
		3.0	0.862	-0.252	-0.440
N2	-0.3	-0.3	-0.370	-0.869	0.329
		-0.2	-0.850	0.460	0.259
		0.5	-0.376	-0.184	-0.908
H3	17.9	-5.5	0.984	-0.148	-0.098
		-4.9	0.174	0.687	0.706
		10.5	0.037	0.712	-0.702
H4	30.3	-6.4	0.885	-0.417	-0.208
		-5.2	0.089	-0.287	0.954
		11.6	0.458	0.862	0.216
H5	107.0	-8.2	0.340	0.209	0.917
		-2.1	-0.366	0.928	-0.076
		10.3	-0.866	-0.310	0.392
H6	2.2	-1.2	0.215	0.897	-0.387
		-0.6	-0.539	0.439	0.719
		1.7	0.815	0.054	0.577
H7	0.7	-1.4	-0.278	-0.694	0.664
		-1.0	0.784	-0.564	-0.260
		2.4	0.555	0.448	0.701
H8	-52.2	-38.1	0.530	0.842	0.103
		-2.4	0.749	-0.407	-0.522
		40.5	-0.398	0.354	-0.847
H9	2.0	-5.5	0.449	-0.435	0.780
		-4.2	-0.781	0.232	0.579
		9.6	-0.434	-0.870	-0.236
H10	105.4	-5.3	-0.377	0.809	-0.451
		-2.6	0.922	0.282	-0.265
		7.9	0.087	0.516	0.852

E: COLEMANS TENSORER

[19]

56

Table R1
Hyperfine and \bar{g} tensors for radical I in partially
deuterated l-asparagine at 77K.

Principal Values	Direction Cosines		
	Hyperfine		
66.83 (MHz)	-.0402	-.4472	.8935
58.00	-.9214	-.3293	-.2063
53.80	-.3865	.8316	.3988
59.55 Isotropic			
	\bar{g} Tensor		
2.0036	.0877	.5732	.8147
2.0034	.1434	.8020	-.5799
2.0025	.9858	-.1677	.0119

Table R2
 Hyperfine tensors for Radical II in partially deuterated
 l-asparagine at 77K.

	Principal Values (MHz)	Direction Cosines		
A_{II-H_9}	9.03	.4464	-.6803	.5813
	6.05	-.7293	-.6530	-.2043
	<u>5.04</u>	-.5186	.3328	.7876
	6.71 Isotropic			
$A_{II-H_{10}}$	88.27	.4167	-.6893	-.5927
	79.09	-.7642	-.6187	.1822
	<u>76.33</u>	-.4923	.3770	-.7846
	81.23 Isotropic			
$\alpha-H$	-89.84	-.4716	.8718	.1325
	-52.59	-.6631	-.2516	-.7050
	<u>-16.78</u>	-.5813	-.4203	.6968
	53.07 Isotropic			
N	-19.55	-.4512	-.8685	.2059
	-15.30	.6394	-.1540	.7533
	<u>-11.63</u>	.6226	.4712	-.6248
	-15.49 Isotropic			
N quadrupole approximately ± 1.04 to ± 1.44 MHz				
D	14.33	.8945	.3378	.2929
	13.44	-.1445	.8384	.5256
	<u>11.45</u>	.4231	-.4278	.7987
	13.07 Isotropic			

D quadrupole from ± 0.8 to ± 0.2 MHz

A second deuterium line was observed with hyperfine
 coupling of approximately 17 MHz.

Table R3
 Hyperfine tensors for radical III in partially deuterated
 l-asparagine at 77K.

	<u>Principle Values</u> (MHz)	<u>Direction Cosines</u>		
A_{III-H_9}	64.7	-.6654	.6438	.3778
	49.7	-.6119	-.1806	-.7700
	<u>48.3</u>	.4275	.7436	-.5141
	54.2 Isotropic			
$A_{III-H_{10}}$	47.5	-.8626	-.5057	.0127
	33.0	.3809	-.6657	-.6417
	<u>29.2</u>	-.3329	.5487	-.7669
	36.6 Isotropic			

Table R4

Hyperfine tensor for line 4.2-1 as an up frequency ENDOR line (in partially deuterated l-asparagine).

<u>Principle Values</u> (MHz)	<u>Direction Cosines</u>		
72.06	.8843	-.3579	.2997
62.07	-.0541	.5590	.8274
60.33	.4637	.7479	-.4750
64.82 Isotropic			

Primary radiation-induced radicals in *L*-asparagine monohydrate at 6 K: EMR and DFT-PBC studies



UiO : Department of Physics
University of Oslo

Live F. Øyen¹, Siv G. Aalbergsjø¹, Ingerid S. Knudtsen^{1,2,3}, Eli O. Hole¹ and Einar Sagstuen¹

Background

Detailed knowledge of the radiation physics and radiation chemistry of amino acids is necessary for the understanding of radiation-induced interactions between DNA and protein in the chromatin.

Some of the most essential contact points between DNA and the histones in the nucleosome complex are *L*-lysine, *L*-asparagine and *L*-arginine. Their amine-containing side chains hydrogen-bond with the sugar and phosphate group in DNA. The radiation induced radicals in *L*-asparagine monohydrate at 295 K are known [1], but understanding the nature of the early radiation induced products requires experiments performed at the lowest attainable temperatures.

The present work establishes the primary radiation-induced chemistry in *L*-asparagine monohydrate at 6 K, and provides knowledge of the early charge transfer processes.

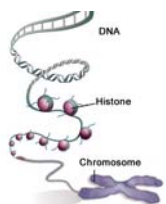


Figure 1: Packing of DNA into chromosomes

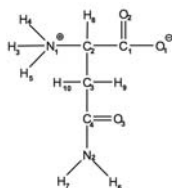


Figure 2: *L*-asparagine

Methods

The experimental method used is Electron Magnetic Resonance (EMR) including EPR and the adjoint techniques ENDOR and EIE. EMR experiments are performed using crystalline *L*-asparagine which is X-irradiated *in situ* at 6 K. Computational modeling of radicals in the crystals is done using DFT methodology with Periodic Boundary Conditions (PBC) and the BLYP functional.



Figure 3: The experimental setup

Results

The analysis of experimental data and related computational modeling indicates that three radical species are formed and stabilized at 6 K. Two of these are reduction products; radical **I** (figure 4, 5 and 6) and radical **II** (figure 7 and 8), and one is an oxidation product; radical **III** (figure 9 and 10).

Product **I** is indicative of an event that may be involved in charge transfer chains in nucleosomes, and will be studied closely.

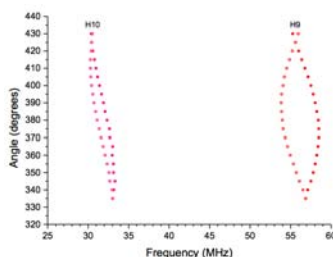


Figure 5: Variation in ENDOR resonance positions due to the crystal's alignment in the magnetic field. The lines represent radical **I**, and show the interaction with the two β -protons H10 and H9 marked in figure 6.

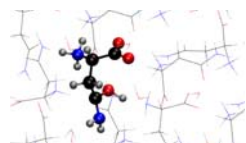


Figure 4: DFT modelled structure of product **I**.

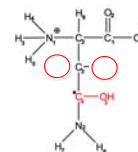


Figure 6: **I**. Protonated amide due to the crystal's alignment in the magnetic field. The product is formed by one-electron reduction of the side chain amide carbonyl group.

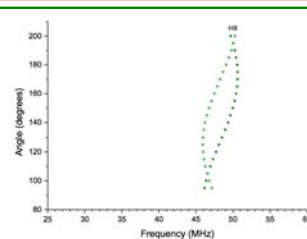


Figure 7: Variation in ENDOR resonance positions due to the crystal's alignment in the magnetic field. The lines represent radical **II**, and show the interaction with the β -proton H8 marked in figure 8.

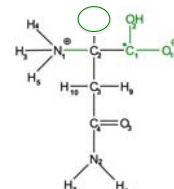


Figure 8: **II**. Protonated carboxyl anion. The product is formed by one-electron reduction of the backbone carboxyl-group.

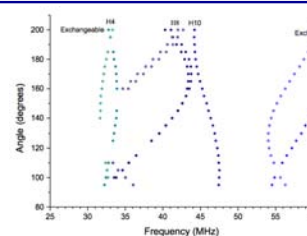


Figure 9: Variation in ENDOR resonance positions due to the crystal's alignment in the magnetic field. The lines represent radical **III**, and show the interaction with the β -protons H4, H5 and H10 and the α -proton H8 marked in figure 10.

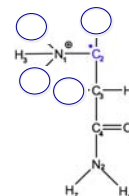


Figure 10: **III**. The radical is formed by one-electron oxidation of the amino acid backbone followed by loss of the carboxyl group.

¹ Department of Physics, University of Oslo. ² The Intervention Centre, Oslo University Hospital. ³ Department of Medical Physics, Oslo University Hospital

[1] Knudtsen, I. S., Strålningssinduserte radikaler i enkrystaller av *L*-asparagin monohydrat ved 295 K. Thesis, Department of Physics, UiO. 2008.

